



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 694**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/533** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**C07F 15/00** (2006.01)

**C07K 14/16** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/577** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95928450 .6**

86 Fecha de presentación : **24.07.1995**

87 Número de publicación de la solicitud: **0772774**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.1997**

54

Título: **Determinación de una inmunoglobulina específica mediante el empleo de un antígeno múltiple.**

30

Prioridad: **25.07.1994 DE 4426276**  
**31.08.1994 DE 4430972**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73

Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**  
**Sandhofer Strasse 116**  
**68305 Mannheim, DE**

72

Inventor/es: **Wienhues-Thelen, Ursula-Henrike;**  
**Kruse-Müller, Cornelia;**  
**Höss, Eva;**  
**Faatz, Elke;**  
**Ofenloch-Hähne, Beatus;**  
**Seidel, Christoph y**  
**Wiedmann, Michael**

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 268 694 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Determinación de una inmunoglobulina específica mediante el empleo de un antígeno múltiple.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de una inmunoglobulina específica mediante el empleo de antígenos que contienen varias regiones epítopo.

10 La detección de inmunoglobulinas en líquidos corporales, en particular en sueros humanos, se emplea para el diagnóstico de infecciones con microorganismos, en particular, virus, como p. ej., el HIV, el virus de la hepatitis, etc. La existencia de inmunoglobulinas específicas en las muestras investigadas se detecta habitualmente mediante la reacción con uno o varios antígenos, los cuales reaccionan con las inmunoglobulinas específicas. Los procedimientos para la determinación de inmunoglobulinas específicas en el líquido de muestra, deben ser sensibles, fiables, fáciles y rápidos.

15 En los últimos años se han desarrollado de forma creciente, sistemas de detección a base de grupos de marcado no radiactivos, con los cuales podía determinarse la existencia de un analito, p. ej., un anticuerpo específico en la muestra investigada con ayuda de sistemas de detección óptica (p. ej., luminiscencia o fluorescencia), RMN activa o precipitación de metales.

20 La patente EP-A 0 307 149 da a conocer un ensayo inmunológico para un anticuerpo, en el cual se emplean como antígenos dos polipéptidos recombinantes, uno de los cuales se inmoviliza en una fase sólida, y el otro lleva un grupo de marcado, de manera que ambos antígenos recombinantes se expresan en diferentes organismos, para aumentar la especificidad de la detección.

25 La patente EP-A-0 366 673 da a conocer un procedimiento para la detección de anticuerpos en una muestra, en el cual es detectado un anticuerpo mediante la reacción con un antígeno purificado marcado, y con el mismo antígeno purificado en una forma unida a una fase sólida. Como antígeno se menciona por ejemplo la IgG humana.

30 La patente EP-A-0 386 713 describe un procedimiento para la detección de anticuerpos contra el HIV mediante el empleo de dos soportes sólidos, en donde en ambos soportes sólidos se inmovilizan diferentes antígenos HIV, los cuales se ponen en contacto cada vez con un alícuota de una muestra y un antígeno HIV marcado, de forma que la existencia de anticuerpos se detecta mediante una reacción positiva en por lo menos uno de los ensayos. Como antígenos del HIV se dan a conocer polipéptidos obtenidos recombinantemente.

35 La patente EP-A-0 507 586 describe un procedimiento para la ejecución de un ensayo inmunológico para una inmunoglobulina específica, según el cual una muestra es puesta en contacto con dos antígenos capaces de unirse a la inmunoglobulina, en donde el primer antígeno lleva un grupo adecuado para la unión a un soporte sólido, y el segundo antígeno lleva un grupo de marcado. El grupo de marcado puede ser un grupo de marcado directo, p. ej., una enzima, un cromógeno, una partícula metálica o también un grupo indirecto de marcado, es decir, el grupo de marcado portado por el antígeno puede reaccionar con un receptor para el grupo de marcado, el cual de nuevo lleva un grupo generador de una señal. Como ejemplo de un tal grupo indirecto de señalización puede citarse un derivado de fluoresceína cuyo receptor es un anticuerpo, el cual se copula de nuevo con una enzima. Como antígenos, se dan a conocer polipéptidos como por ejemplo el antígeno de superficie de la hepatitis B. En este antígeno se introducen por derivatización, grupos -SH, con los cuales se copula la fluoresceína.

45 La patente EP-A-0 507 587 da a conocer un procedimiento apropiado para la detección específica de los anticuerpos IgM, según el cual la muestra se incuba con un antígeno marcado, el cual está dirigido contra el anticuerpo a detectar, y un segundo anticuerpo, el cual está igualmente dirigido contra el anticuerpo a detectar, y es capaz de unión con una fase sólida.

50 J.P. Tam *et al.*, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5409 da a conocer el empleo de antígenos multímeros como inmunológicos.

55 Los procedimientos inmunológicos de detección ya conocidos en el estado actual de la técnica, según el concepto del ensayo puente, según el cual se emplea un antígeno marcado y un antígeno capaz de unirse a una fase sólida, presentan sin embargo considerables inconvenientes. En particular, se produce una escasa sensibilidad, cuando entre el anticuerpo a detectar y el antígeno existe una relativamente pequeña afinidad. Este es particularmente el caso de que haya tenido lugar una reciente conversión del suero y/o por la aparición de nuevos subtipos del microorganismo infeccioso. Otra desventaja del hasta ahora conocido concepto del ensayo puente consiste en el riesgo de una falsa valoración negativa de las muestras de alta titulación a causa del efecto Hook.

60 El problema que sirve de base a la presente invención es la puesta a punto de un procedimiento para la detección de un anticuerpo específico, en el cual las desventajas del estado actual de la técnica están solventadas por lo menos parcialmente, y el cual posee, en particular en el caso de una conversión de suero recién efectuada y en los nuevos subtipos de microorganismos, una suficiente sensibilidad. Además con el procedimiento según la invención debe lograrse una disminución del efecto Hook.

65 Este problema se resuelve mediante un procedimiento para la determinación inmunológica de un anticuerpo específico en un líquido de muestra, en donde el líquido de muestra se incuba en presencia de una fase sólida con dos

## ES 2 268 694 T3

antígenos dirigidos contra los anticuerpos a determinar, en donde el primer antígeno lleva por lo menos un grupo de marcado y el segundo antígeno (a) está unido a la fase sólida o (b) está en una forma capaz de unirse a la fase sólida, y detecta el anticuerpo a determinar por determinación del grupo de marcado en la fase sólida o/y en la fase líquida, caracterizado porque por lo menos uno de los dos antígenos comprende varias regiones de epítomos, los cuales reaccionan con el anticuerpo a determinar.

Sorprendentemente se comprobó que en el ensayo inmunológico del ensayo puente empleando por lo menos un antígeno multímero, esto es, un antígeno con múltiples regiones epítomo, mejora la sensibilidad del ensayo en particular contra los sueros con anticuerpos que frente a los antígenos empleados poseen una escasa afinidad. Además, el procedimiento según la invención conduce a una clara disminución del riesgo de valoraciones de falsos negativos de muestras de alta titulación a causa del efecto Hook. La optimización de la presentación del antígeno mediante la elevación de la densidad de epítomos en el concepto del ensayo puente conduce generalmente a una mejora de la reactividad con inmunoglobulinas específicas en sueros policlonales, como es el caso de un líquido de muestra, como p. ej., suero. Otra ventaja del procedimiento según la invención consiste en que los antígenos multímeros presentan una estabilidad claramente mayor frente a los antígenos monómeros.

En el caso de un procedimiento para la determinación inmunológica de un anticuerpo específico según el concepto del ensayo puente, se emplean dos antígenos. En una primera versión preferida del procedimiento según la invención se emplea como antígeno marcado un antígeno multímero y como antígeno secundario de fase sólida, un antígeno monómero. En una segunda versión del procedimiento según la invención se puede emplear como antígeno secundario de fase sólida un antígeno multímero y como antígeno marcado un antígeno monómero. En una tercera versión preferida, se puede emplear como antígeno marcado y como antígeno secundario de fase sólida, antígenos multímeros en cada caso.

Los antígenos multímeros contienen múltiples regiones epítomo, es decir con estructuras que reaccionan inmunológicamente con los anticuerpos a determinar, de preferencia secuencias peptídicas o polipeptídicas. Las regiones epítomo están enlazadas entre sí de preferencia mediante regiones inmunológicamente inactivas, p. ej., mediante regiones espaciadoras.

Se emplean antígenos multímeros que comprenden varias regiones epítomo iguales.

Los antígenos multímeros contienen de preferencia más de 1 a 80 regiones epítomo inmunológicamente reactivas, con particular preferencia más de 1 a 40 regiones epítomo. Las regiones epítomo pueden estar copuladas en un soporte de molécula superior o respectivamente pueden estar ligadas entre sí mediante regiones espaciadoras.

Las regiones epítomo son secuencias peptídicas sintéticas inmunológicamente reactivas, con una longitud de preferencia hasta 50 aminoácidos o secuencias polipeptídicas recombinantes con una longitud de preferencia hasta 1000 aminoácidos. Los epítomos peptídicos sintéticos contienen junto a la propia región epítomo de preferencia una región espaciadora la cual puede servir por ejemplo para la copulación con otros epítomos o un soporte o/y para la copulación de grupos de marcado o respectivamente grupos de unión a la fase sólida.

La región espaciadora es de preferencia una secuencia peptídica inmunológicamente inactiva con una longitud de 1 a 10 aminoácidos. Los aminoácidos de la región espaciadora se escogen de preferencia entre el grupo formado por la glicina,  $\beta$ -alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ácido  $\varepsilon$ -aminocaprónico, lisina y compuestos de fórmula estructural  $\text{NH}_2[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_x\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ , en donde n es 2 ó 3 y x es de 1 a 10.

La región espaciadora consiste de preferencia en una serie continua de aminoácidos en el terminal amino o/y el terminal carboxilo de la región epítomo.

En un ensayo inmunológico según el concepto del ensayo puente, se emplea un primer antígeno marcado. Para el procedimiento según la invención pueden emplearse todos los grupos de marcado conocidos, p. ej., grupos de marcado radiactivo y no radiactivo. Los grupos de marcado no radiactivos preferidos pueden detectarse directa y/o indirectamente. En un marcado directamente detectable, se localiza directamente en el antígeno un grupo que genera una señal de medición detectable directamente en el antígeno. Por ejemplo, dichos grupos directamente generadores de una señal, pueden ser los cromógenos (grupos fluorescentes o luminiscentes, colorantes), enzimas, grupos RMN-activos o partículas metálicas, las cuales están copuladas de manera conocida a un antígeno peptídico o polipeptídico. De preferencia, el grupo de marcado directamente detectable es un quelato metálico detectable por fluorescencia o electroquimioluminiscencia, con particular preferencia, un quelato de rutenio, renio, iridio u osmio, en particular un quelato de rutenio, p. ej., un quelato de rutenio-(bis-piridilo)<sub>3</sub><sup>2+</sup>. Otros grupos de marcado de un quelato metálico apropiados, están descritos por ejemplo, en las patentes EP-A-0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 y WO 92/14138.

Otra clase de marcado apropiado para el antígeno, es el marcado indirectamente detectable. En esta clase de marcado, el antígeno está copulado con un grupo indirectamente detectable, p. ej., un grupo biotina o un grupo hapteno, el cual es a su vez detectable mediante la reacción con un socio de unión apropiado (estreptavidina, avidina, o respectivamente anticuerpo anti-hapteno), el cual lleva a su vez un grupo generador de una señal. De preferencia, se emplea como grupo indirecto de marcado como hapteno, una molécula orgánica con un peso molecular de 100 hasta 2000, de preferencia de 150 hasta 1000.

## ES 2 268 694 T3

Los haptenos son capaces de unirse con un receptor específico para el hapteno correspondiente. Ejemplos de receptores son los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, los cuales están dirigidos contra el hapteno, o bien otro socio de unión específico para el hapteno, p. ej., estreptavidina o avidina, cuando el hapteno es la biotina. De preferencia, el hapteno se escoge entre el grupo formado por las esterinas, ácidos gálicos, hormonas sexuales, corticoides, cardenólidos, cardenólido-glicosidos, bufadienolidas, esteroide-sapogeninas y esteroidalcaloides. Con particular preferencia, el hapteno se escoge del grupo formado por los cardenólidos y cardenólido-glicosidos. Representantes de estas clases de sustancias son la digoxigenina, digitoxigenina, gitoxigenina, estrofantidina, digoxina, digitoxina, ditoxina y estrofantina, en donde la digoxigenina y la digoxina son particularmente preferidas. Otro hapteno apropiado es por ejemplo la fluoresceína o un derivado apropiado de la fluoresceína.

El receptor para el hapteno está copulado con un grupo generador de una señal, de preferencia, una enzima, como por ejemplo, la peroxidasa, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, ureasa o Q- $\beta$ -replicasa. El grupo generador de la señal puede ser también un grupo cromógeno, radiactivo o RMN-activo, o una partícula metálica (p. ej., oro). La copulación del hapteno con el antígeno puede por ejemplo efectuarse de manera que el hapteno se copula en forma de un derivado éster activo en el terminal amino o/y en grupos amino secundarios libres del antígeno peptídico o polipeptídico.

La expresión “éster activo” en el sentido que se le da en la presente invención, comprende los grupos éster activos que pueden reaccionar con grupos amino libres de péptidos en tales condiciones que no puede tener lugar ninguna reacción secundaria molesta con otros grupos reactivos del péptido. De preferencia se emplea como derivado de éster activo un éster de N-hidroxisuccinimida. Ejemplos apropiados de hapteno-derivados de éster activo son la digoxina-4”-hemiglutarato-N-hidroxisuccinimida éster, digoxigenin-3-carboximetil-eter-N-hidroxisuccinimida éster, éster N-hidroxisuccinimida del ácido digoxigenin-3-O-metilcarbonil- $\epsilon$ -aminocaprónico, éster N-hidroxisuccinimida de digoxigenin-3-hemisuccinato, éster N-hidroxisuccinimida de digitoxin-4”-hemiglutarato, y éster N-hidroxisuccinimida de digitoxigenin-3-hemisuccinato. Estos derivados de hapteno pueden adquirirse comercialmente en la firma Fa. Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania). Junto con los ésteres de la N-hidroxisuccinimida pueden emplearse también los análogos ésteres de p-nitrofenilo, pentafluorfenilo, imidazolilo, ó de N-hidroxibenzotriazolilo.

Junto al primer antígeno marcado se emplea también en el procedimiento según la invención, un segundo antígeno, el cual está unido a la fase sólida o está presente en una forma capaz de unirse a la fase sólida, y puede ser igualmente un antígeno múltimero. La unión entre el antígeno secundario de fase sólida y la fase sólida puede ser covalente o adsorbente, y puede tener lugar directamente mediante grupos de enlace químicos o mediante una acción recíproca específica, p. ej., biotina - estreptavidina/avidina, antígeno - anti-cuerpo, hidrato de carbono - lectina. De preferencia, el antígeno secundario de fase sólida es un antígeno biotinilado y la fase sólida correspondiente está recubierta con estreptavidina o avidina. La copulación de los grupos biotina con el antígeno puede tener lugar de manera conocida, p. ej., mediante la introducción de derivados éster activos de biotina. Dichos métodos ya son conocidos por el experto.

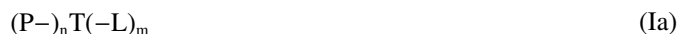
El número de grupos de marcado o de unión a la fase sólida sobre el antígeno múltimero es variable, es decir, puede existir un solo grupo o varios grupos. En varias versiones del procedimiento según la invención, se prefiere que hayan por lo menos 3, y con particular preferencia de 3 a 20 grupos de marcado o grupos de unión a la fase sólida. De esta manera, puede lograrse una sorprendentemente elevada mejora de la sensibilidad y una disminución significativa del efecto Hook (valoración falsamente negativa de muestras fuertemente positivas).

La presente invención está basada en el reconocimiento de que un ensayo inmunológico para la determinación de un anticuerpo específico es ventajoso en un líquido de muestra, cuando por lo menos uno de los dos antígenos empleados para el ensayo, es un antígeno múltimero, es decir, que contiene preferentemente varias regiones epítipo iguales. La expresión “región epítipo” en el sentido de la presente invención significa una estructura, de preferencia una secuencia de un péptido o polipéptido, que presenta una reacción específica con el anticuerpo a determinar. Para la colocación de varias regiones epítipo sobre el antígeno múltiple existen principalmente varias posibilidades.

En una primera versión se emplea como antígeno múltimero un soporte que no reacciona con el anticuerpo a determinar, al cual se copulan covalentemente las regiones epítipo. Ejemplos de soportes apropiados son los péptidos, polipéptidos o soportes sintéticos, p. ej., el dextrano, partículas de oro, dendritas, etc. Ejemplos de polipéptidos apropiados son las albúminas, p. ej., albúmina de suero bovino, inmunoglobulinas no específicas, fragmentos de inmunoglobulinas,  $\beta$ -galactosidasa, polilisina y otras proteínas con estructura simétrica. Cuando se utiliza un soporte hay que tener en cuenta que no presente ninguna reactividad cruzada con los anticuerpos del líquido de muestra.

Las regiones epítipo están de preferencia copuladas mediante un empalme bifuncional en los grupos reactivos del soporte, p. ej., grupos  $\text{-NH}_2$  ó grupos  $\text{-SH}$ . De preferencia, la copulación tiene lugar mediante grupos  $\text{NH}_2$  del soporte.

En esta versión de la invención se emplea de preferencia un antígeno de fórmula general



ó bien



## ES 2 268 694 T3

en donde T significa un soporte, P significa secuencias peptídicas o polipeptídicas, que contienen iguales o diferentes regiones epítipo inmunológicamente reactivas y están copuladas covalentemente al soporte, y significan grupos L de marcado o grupos capaces para la unión a una fase sólida, los cuales están covalentemente copulados al soporte o respectivamente a las secuencias peptídicas o polipeptídicas, n es un número mayor de 1 a 40 y m un número de 1 a 10. El símbolo n y m no deben significar ningún número entero, puesto que estadísticamente puede ocurrir el recubrimiento del soporte con grupos epítomos o con grupos de marcado o respectivamente grupos de unión a la fase sólida en una mezcla de reacción. De preferencia, n es mayor o igual a 2.

Las secuencias peptídicas o polipeptídicas copuladas al soporte, comprenden de preferencia secuencias peptídicas sintéticas con una longitud de 6 a 50 aminoácidos o secuencias polipeptídicas recombinantes con una longitud de preferencia hasta 1000 aminoácidos.

Las secuencias peptídicas sintéticas pueden contener eventualmente junto a la propia región epítipo todavía una región espaciadora como se ha definido más arriba, la cual puede estar colocada por ejemplo entre el epítipo y el soporte o/y entre el epítipo y el grupo de marcado o respectivamente el grupo de unión a la fase sólida.

Los epítomos péptidos o polipéptidos pueden copularse mediante el terminal N, el terminal C ó mediante grupos reactivos, a la cadena lateral del soporte. Una posibilidad de copulación consiste en activar las moléculas del soporte por reacción con conocidas sustancias de empalme (p. ej., ácido maleinimidohexanoico, ácido maleinimidopropiónico, ácido maleinimidobenzoico) en un grupo NH<sub>2</sub> y copular covalentemente un derivado peptídico activado en -SH, al soporte. Los grupos de marcado o de unión a la fase sólida están habitualmente en forma de ésteres activos en la molécula del soporte o/y copulados en las regiones epítipo. Puede pensarse sin embargo, en otras posibilidades de copulación, p. ej., mediante fotoempalmes bifuncionales.

Para la síntesis de antígenos multímeros, los cuales contienen los epítomos copulados en un soporte inerte, se obtienen los correspondientes péptidos, de preferencia con una función mercapto reactiva, p. ej., mediante la introducción de un radical cisteína adicional. A este respecto, el péptido puede modificarse en el terminal N, en el terminal C, ó en cualquier lugar de la secuencia, con un empalme. Para la transformación en un antígeno multímero se puede cargar, por ejemplo un soporte, el cual contiene grupos amino primarios, primeramente con el correspondiente derivado éster activo del grupo de marcado y a continuación con grupos maleinimido-alquilo. Con ello, los grupos amino de las cadenas laterales ε-amino de los radicales lisina del soporte, se marcan parcialmente con el grupo de marcado (p. ej., la digoxigenina o biperidilrutenio) o el grupo de unión a la fase sólida (p. ej., la biotina), y por otra parte se convierten en grupos maleinimida).

A continuación, en otro paso, el péptido o la mezcla de péptidos con las regiones epítipo deseadas, se copula mediante la función mercapto reactiva, al soporte modificado con la maleinimida. Cuando el grupo de marcado está situado directamente sobre el péptido, tiene lugar análogamente la síntesis del antígeno multímero, sólo que ahora reacciona el péptido correspondiente marcado, activado con -SH, con el soporte.

En otra versión de la invención se puede emplear un antígeno multímero el cual comprende varias regiones epítipo copuladas entre sí covalentemente, directamente o mediante unas regiones espaciadoras. De preferencia la unión de los epítomos tiene lugar por lo menos parcialmente, mediante moléculas de empalme trifuncionales, de manera que el antígeno comprende por lo menos un lugar de ramificación y de preferencia, de 1 a 7 lugares de ramificación.

De preferencia, se emplea en esta versión un antígeno de fórmula general II:



en donde P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> y P<sup>4</sup> significan secuencias peptídicas con una longitud de hasta 50 aminoácidos, en donde por lo menos 2 secuencias de péptidos contienen iguales o diferentes regiones epítipo inmunológicamente reactivas, r es 1 ó 2, s es un número entero de 0 a 4, y t es un número entero de 0 a 8, en donde el antígeno contiene por lo menos un lugar de ramificación y por lo menos un grupo de marcado o un grupo capaz de unirse a una fase sólida.

El antígeno de fórmula II forma una estructura como la de un árbol con máximo 7 lugares de ramificación, cuando P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> y P<sup>4</sup> son secuencias peptídicas lineales, y contiene de preferencia, de dos a ocho regiones epítipo, iguales o diferentes, inmunológicamente reactivas. Las regiones epítipo están de preferencia unidas entre sí no directamente sino mediante regiones espaciadoras. Las regiones espaciadoras son de preferencia secuencias de péptidos inmunológicamente inactivas con una longitud de 1 a 10 aminoácidos, como se ha definido más arriba. No todas las secuencias de péptidos P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> y P<sup>4</sup> deben contener regiones epítipo, sino que son posibles también estructuras en las cuales estas secuencias constan solamente de regiones espaciadoras. En la estructura pueden incorporarse ramificaciones mediante el empleo de aminoácidos trifuncionales, p. ej., lisina o ornitina.

Además, el antígeno de fórmula general II contiene por lo menos un grupo de marcado o un grupo de unión a la fase sólida, como se ha definido más arriba. Estos grupos pueden copularse por ejemplo selectivamente al final o/y a las cadenas laterales reactivas de las secuencias de péptidos.

Todavía otra versión de los antígenos multímeros son las llamadas proteínas mosaico, es decir, polipéptidos de fusión recombinantes cuya secuencia de aminoácidos contiene varias regiones epítipo inmunológicamente reactivas, las cuales están eventualmente unidas mediante regiones espaciadoras inmunológicamente inactivas. Las proteínas mosaico recombinantes pueden obtenerse preparando una secuencia de ADN que codifica la proteína deseada, y  
5 llevando a una célula anfitriona recombinante para la expresión. Esta clase de procedimientos son ya conocidos por el experto en el campo de la biología molecular y están descritos en los tratados estándar (p. ej., Sambrook *et al.*, Molecular Cloning. A Laboratory Manual ("Clonado molecular. Un manual de laboratorio") 2ª edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press). La introducción de los grupos de marcado o de unión a la fase sólida en la proteína recombinante se puede efectuar igualmente mediante métodos ya conocidos.

10 En una versión preferida, las regiones epítipo son secuencias peptídicas sintéticas con una longitud de 6 hasta un máximo de 50, con particular preferencia hasta un máximo de 30 aminoácidos. En esta clase de regiones epítipo pueden introducirse grupos de marcado, o respectivamente grupos de unión a la fase sólida, selectivamente, tanto con respecto a su situación como también respecto al número de los mismos. En el caso de la obtención sintética,  
15 existe la posibilidad de escoger selectivamente, mediante el empleo de determinados grupos de protección en grupos secundarios reactivos, p. ej., grupos amino primarios de los derivados de los aminoácidos empleados, aquellos lugares del péptido los cuales después de una selectiva escisión de los grupos de protección, están disponibles para la reacción con el grupo de marcado introducido.

20 Para ello, se obtiene el péptido con la secuencia deseada de aminoácidos, en una fase sólida, de preferencia mediante un aparato comercial sintetizador de péptidos (p. ej., el aparato A 431 ó A433 de Applied Biosystems). La síntesis se efectúa mediante métodos ya conocidos, de preferencia partiendo del terminal carboxilo del péptido mediante el empleo de derivados de aminoácidos. De preferencia se emplean derivados de aminoácidos, para cuya copulación se derivatiza el necesario grupo final amino con un radical fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). Los grupos secundarios reactivos de los aminoácidos empleados contienen grupos de protección, los cuales después de terminar la síntesis del péptido se escinden sin más. Ejemplos preferidos para ello son los grupos de protección como por ejemplo el  
25 trifenilmetilo (Trt), t-butiléter (tBu), t-butiléster (O tBu), terc.-butoxicarbonilo (Boc) ó 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc).

30 Las cadenas laterales amino de radicales lisina u otros derivados de aminoácidos con grupos laterales amino primarios, los cuales se encuentran en posiciones del péptido que debe ser derivatizado más tarde con un hapteno, p. ej., la digoxina o digoxigenina, están provistas de un primer grupo de protección de amino, el cual está escogido de forma que sea escindible cuantitativamente mediante determinadas condiciones de reacción p. ej., en presencia de un ácido. Un ejemplo para un grupo de protección lábil con ácidos, apropiado, es el Boc. Los grupos laterales de radicales lisina u otros radicales de aminoácidos con grupos laterales amino primarios, con los cuales no se desea ninguna copulación de un hapteno, están provistos de un segundo grupo de protección, el cual se escoge de forma que en las condiciones en las cuales el primer grupo de protección es escindible, él mismo no es escindible. De preferencia, el segundo grupo de protección es también estable en aquellas condiciones en las cuales tiene lugar la escisión del péptido de la fase sólida y la escisión de todos sus grupos de protección. Ejemplos de dichos segundos grupos de protección son los grupos de protección estables a los ácidos, como por ejemplo el fenilacetilo. Junto a los 20 aminoácidos naturales, el péptido puede también contener aminoácidos artificiales como por ejemplo la  $\beta$ -alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ácido  $\epsilon$ -aminocaprónico o norleucina. Estos aminoácidos artificiales se emplean análogamente a los aminoácidos naturales para la síntesis en forma protegida.

45 Una vez terminada la síntesis, tiene lugar eventualmente después de la liberación del péptido de la fase sólida, una escisión de los grupos de protección incluidos los primeros grupos de protección de amino, los cuales se encuentran en las posiciones en las cuales debe tener lugar la copulación del hapteno. A continuación se purifica el producto obtenido de esta manera, de preferencia mediante HPLC. A continuación, tiene lugar la introducción del marcado del hapteno mediante la reacción del péptido con el correspondiente derivado éster activo de hapteno deseado, el cual reacciona con los grupos amino primarios libres, es decir, con el grupo final amino o/y los grupos laterales amino del péptido. Por cada grupo amino primario libre se emplean de preferencia, de 1,5 a 2,5 equivalentes de éster activo. A continuación se purifica el producto de reacción, de preferencia mediante HPLC.

50 Cuando el péptido contiene todavía grupos amino, los cuales se derivatizan con un segundo grupo de protección, como por ejemplo el fenilacetilo, entonces estos grupos de protección se eliminan en el último paso. La eliminación de los grupos de protección fenilacetilo puede efectuarse por ejemplo enzimáticamente con penicilina-G-amidasa inmovilizada o soluble en solución acuosa con un componente de disolvente orgánico a temperatura ambiente.

60 En el caso de que los péptidos obtenidos por el procedimiento según la invención contengan un puente disulfuro intramolecular, la secuencia peptídica puede, después de terminada la síntesis, pero antes de la escisión del grupo de protección Fmoc N-terminal del último aminoácido, oxidarse p. ej., con yodo en hexafluorisopropanol/diclorometano (Cober *et al.* The Peptide Academic Press, Nueva York, 1981, páginas 145 a 147) en la fase sólida, y a continuación escindirlos los grupos de protección Fmoc N-terminal.

65 La introducción de un grupo -SH reactivo puede realizarse por ejemplo mediante copulación de un radical cisteína en el terminal amino del péptido.

## ES 2 268 694 T3

La introducción de grupos de marcado quelatos metálicos en los péptidos sintéticos tiene lugar (a) después de la síntesis de la secuencia peptídica deseada y de preferencia antes de la escisión del péptido de la fase sólida y antes de la escisión de los grupos de protección en grupos laterales reactivos de los derivados de aminoácidos empleados en la síntesis del péptido mediante la copulación de un quelato metálico luminiscente activado, p. ej., de un derivado de éster activo, en el grupo amino primario del terminal N del péptido o/y (b) durante la síntesis del péptido mediante la introducción de derivados de aminoácidos, los cuales están copulados covalentemente con un grupo de marcado de quelato metálico luminiscente, p. ej., mediante una lisina  $\epsilon$ -derivatizada.

La síntesis de antígenos multímeros ramificados puede efectuarse empleando un ácido diaminocarboxílico protegido mediante dos grupos Fmoc, como p. ej., la lisina. La biotilación de los péptidos puede efectuarse por ejemplo mediante la introducción de un derivado de biotina en el terminal N, mientras el péptido está todavía copulado a la fase sólida.

Para el procedimiento según la invención, se emplean de preferencia epítomos de péptidos o polipéptidos de organismos patógenos, p. ej., bacterias, virus y protozoos o de antígenos autoinmunes. De preferencia, la región epítomo inmunológicamente reactiva procede de antígenos virales, p. ej., las secuencias de aminoácidos del HIV I, HIV II, HIV subtipo 0 ó el virus de la hepatitis C (HCV).

De preferencia, se escogen los epítomos del HIV I, HIV II ó respectivamente HIV-subtipo 0, de las regiones gp32, gp41, gp120 y gp24. Los epítomos del HCV se escogen de preferencia de la región Core/Env o de las regiones de proteína no estructuradas NS3, NS4 ó NS5.

De manera particularmente preferida la región epítomo se escoge de las secuencias de aminoácidos del HIV I, HIV II ó HIV subtipo 0, a partir del grupo de secuencias de aminoácidos:

	<b>QARILAVERY</b>	<b>LKDQQLGIW</b>	<b>GASG</b>	<b>(IV)</b>
	<b>LGIWGC SGKL</b>	<b>ICTTAVPWNA</b>	<b>SWS</b>	<b>(V)</b>
30	<b>KDQQLGIWG</b>	<b>SSGKL</b>	<b>(VI)</b>	
	<b>ALETLLQNQQ</b>	<b>LLSLW</b>	<b>(VII)</b>	
	<b>LSLWGCKGKL</b>	<b>VCYTS</b>	<b>(VIII)</b>	
35	<b>WGIRQLRARL</b>	<b>LALETLLQN</b>	<b>(IX) und</b>	
	<b>QAQLNSWGCA</b>	<b>FRQVCHTTVP</b>	<b>WPNDSLT</b>	<b>(X)</b>

o secuencias parciales de las mismas, las cuales tienen una longitud de por lo menos 6 y de preferencia por lo menos 8 aminoácidos.

Las secuencias de aminoácidos I a III proceden de la región gp120 del HIV I, las secuencias de aminoácidos IV a IX proceden de la región gp41 del HIV I, y la secuencia de aminoácidos X procede de la región gp32 del HIV II. Las secuencias de aminoácidos I a X están además representadas en los protocolos de secuencias SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 10. Las secuencias V, VIII y X contienen cada una 2 radicales cisteína, los cuales están de preferencia en forma de un puente de disulfuro.

La zona epítomo de las secuencias de aminoácidos del HCV se escoge de preferencia del grupo de secuencias de aminoácidos:

	<b>SRRFAQALPV</b>	<b>WARPD</b>	<b>(XI)</b>
55	<b>PQDVKFPGGG</b>	<b>QIVGGV</b>	<b>(XII)</b>
	<b>EEASQHLPYI</b>	<b>EQ</b>	<b>(XIII)</b>
	<b>QKALGLLQT</b>	<b>(XIV)</b>	
60	<b>SRGNHVSPTH</b>	<b>YVPESDAA</b>	<b>(XV)</b>
	<b>PQRKNKRNTN</b>	<b>RRPQDVKFPG</b>	
	<b>GGQIVGGV</b>	<b>(XVI) und</b>	
65	<b>AWYELTPAET</b>	<b>TVRLRAYMNT</b>	<b>PGLPV</b>
			<b>(XVII)</b>

## ES 2 268 694 T3

o secuencias parciales de las mismas que tienen una longitud de por lo menos 6 y de preferencia por lo menos 8 aminoácidos. La secuencia XI procede de la región NS5, las secuencias XII y XVI, de la región del núcleo, las secuencias XIII, XIV y XV, de la región NS4 y la secuencia XVII de la región NS3 del HCV. Las secuencias de los aminoácidos XI a XVII están además representadas en los protocolos de secuencia SEQ ID NO. 11 a SEQ ID NO. 17.

Otro objetivo de la presente invención es un reactivo para la determinación inmunológica de un anticuerpo específico en un líquido de muestra, que consta de una fase sólida reactiva, dos antígenos dirigidos contra el anticuerpo a determinar, de los cuales el primer antígeno lleva un grupo de marcado y el segundo antígeno (a) está unido a la fase sólida o (b) está en una forma capaz de unirse a la fase sólida, caracterizado porque por lo menos uno de los dos antígenos comprende varias regiones epítopo, las cuales reaccionan con el anticuerpo a determinar.

En una versión de la presente invención el reactivo contiene un primer antígeno marcado, con varias regiones epítopo, el cual por lo menos lleva un grupo de marcado hapteno, y un receptor para el hapteno, el cual de nuevo contiene un grupo generador de una señal. Además, se prefiere un reactivo que comprende un segundo antígeno lateral de la fase sólida, con varias regiones epítopo, el cual lleva por lo menos un grupo biotina, y una fase sólida reactiva recubierta con estreptavidina o avidina.

Todavía, otro objetivo de la presente invención es el empleo de antígenos multímeros, los cuales comprenden varias regiones epítopo reactivas, en un procedimiento de ensayo inmunológico para la determinación de anticuerpos específicos en un líquido de muestra.

De preferencia, se determinan aquellos anticuerpos que indican la presencia de una infección por microorganismos como por ejemplo, bacterias, virus o protozoos. Con particular preferencia se determinan los anticuerpos dirigidos contra virus, p. ej., los anticuerpos dirigidos contra el HIV ó los virus de la hepatitis. El líquido de muestra es de preferencia suero o plasma, con particular preferencia el suero o plasma humano. Además se prefiere que los antígenos multímeros según la invención se empleen en un procedimiento inmunológico en el formato de un ensayo puente.

La ejecución del ensayo comprende de preferencia una mezcla del líquido de muestra con el primer antígeno y con el segundo antígeno lateral de la fase sólida, para obtener un complejo marcado, inmovilizado, del primer antígeno, anti-cuerpos y el segundo antígeno unido a la fase sólida. Contrariamente a otros formatos de ensayo para la detección de anticuerpos, el formato del ensayo puente conduce tanto a una mejora de la sensibilidad, es decir, se reconocen todas las clases de inmunoglobulinas como por ejemplo, IgG, IgM, IgA e IgE, como también de la especificidad, es decir, se disminuye la reactividad no específica. Mediante el procedimiento según la invención se logra una detección independiente de la clase de inmunoglobulina específica con una sensibilidad mejorada. La mejora de la sensibilidad se refiere en particular al reconocimiento adicional de inmunoglobulinas de escasa afinidad, p. ej., la IgM con antígenos multímeros, mientras que con antígenos monómeros solamente se reconocen bien los anticuerpos con una alta afinidad. La especificidad y sensibilidad del ensayo puente con doble antígeno puede además mejorarse si el ensayo se realiza en dos fases, en el cual en un primer paso el líquido de muestra se mezcla con el primer y segundo antígeno, y a continuación, de preferencia después de 1 a 4 horas, con particular preferencia, de 1,5 a 2,5 horas, se añade el receptor para el marcado con hapteno del primer antígeno, el cual lleva el grupo generador de la señal.

Por añadidura, se describe la presente invención mediante los siguientes ejemplos, protocolo de las secuencias y figuras.

Significados de las siguientes expresiones:

- |                |   |
|----------------|---|
| SEQ ID NO. 1:  | La secuencia de aminoácidos de un epítopo de la región gp120 del HIV I;                     |
| SEQ ID NO. 2:  | La secuencia de aminoácidos de otro epítopo de la región gp120 del HIV I;                   |
| SEQ ID NO. 3:  | La secuencia de aminoácidos de otro epítopo de la región gp120 del HIV I, subtipo O;        |
| SEQ ID NO. 4:  | La secuencia de aminoácidos del epítopo de la región gp41 del HIV I;                        |
| SEQ ID NO. 5:  | La secuencia de aminoácidos de otro epítopo de la región gp41 del HIV I;                    |
| SEQ ID NO. 6:  | La secuencia de aminoácidos todavía de otro epítopo de la región gp41 del HIV I;            |
| SEQ ID NO. 7:  | La secuencia de aminoácidos de un epítopo de la región gp41 del HIV I, subtipo O;           |
| SEQ ID NO. 8:  | La secuencia de aminoácidos de otro epítopo de la región gp41 del HIV I, subtipo O;         |
| SEQ ID NO. 9:  | La secuencia de aminoácidos todavía de otro epítopo de la región gp41 del HIV I, subtipo O; |
| SEQ ID NO. 10: | La secuencia de aminoácidos de un epítopo de la región gp32 del HIV II;                     |

## ES 2 268 694 T3

- SEQ ID NO. 11: La secuencia de aminoácidos de un epítipo de la región NS5 del HCV;
- SEQ ID NO. 12: La secuencia de aminoácidos de un epítipo de la región del núcleo del HCV;
- 5 SEQ ID NO. 13: La secuencia de aminoácidos de un epítipo de la región NS4 del HCV;
- SEQ ID NO. 14: La secuencia de aminoácidos de otro epítipo de la región NS4 del HCV;
- SEQ ID NO. 15: La secuencia de aminoácidos todavía de otro epítipo de la región NS4 del HCV;
- 10 SEQ ID NO. 16: La secuencia de aminoácidos de otro epítipo de la región del núcleo del HCV;
- SEQ ID NO. 17: La secuencia de aminoácidos de un epítipo de la región NS3 del HCV;

15 Figura 1: La secuencia de aminoácidos del antígeno HIV p24 recombinante,

Figura 2: Una comparación de las señales de medición en un ensayo puente de doble antígeno empleando un monómero y un antígeno multímero rutenilado HIV-gp120, y

20 Figura 3: Una comparación de las señales de medición de un ensayo puente con doble antígeno empleando un monómero y un antígeno multímero biotilado HIV gp41.

Ejemplo 1

25 *Obtención de las regiones epítipo de péptidos*

Las regiones epítipo de péptidos se obtuvieron mediante la síntesis fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) - péptido de fase sólida en un sintetizador de péptidos por partidas, p. ej., de Applied Biosystems A431 ó A433. Para ello se emplearon cada vez 4,0 equivalentes de los derivados de aminoácidos representados en la tabla 1:

TABLA 1

A	Fmoc-Ala-OH
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH
D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH
F	Fmoc-Phe-OH
G	Fmoc-Gly-OH ,
H	Fmoc-His(Trt)-OH
I	Fmoc-Ile-OH
K1	Fmoc-Lys(fenilacetil) -OH
K2	Fmoc-Lys(Boc)-OH
K3	Boc-Lys(Fmoc)-OH
K4	Fmoc-Lys(BPRu)-OH
L	Fmoc-Leu-OH
M	Fmoc-Met-OH
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
P	Fmoc-Pro-OH
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH

R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
T	Fmoc-Thr(tBu)-OH
U	Fmoc-β-alanina H
V	Fmoc-Val-OH
W	Fmoc-Trp-OH
Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
Z	Fmoc-ε-ácido aminocaprónico
Nle	Fmoc-norleucina OH
Abu	Fmoc-γ-ácido aminobutírico .OH

5

10

15

20

25 En presencia de radicales cisteína en la secuencia del péptido, tiene lugar inmediatamente después del final de la síntesis una oxidación en la fase sólida con yodo en hexa-fluorisopropanol/diclorometano.

30

Los aminoácidos o derivados de aminoácidos se disolvieron en N-metil-pirrolidona. El péptido se sintetizó en 400-500 mg de resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi (Tetrahedron Letters 28 (1987), 2107) con una carga de 0,4-0,7 mmoles/g (JACS 95 (1973), 1328). Las reacciones de copulación se efectuaron con respecto al derivado de Fmoc-aminoácido, con 4 equivalentes de dicitlo-hexilcarbodiimida y 4 equivalentes de N-hidroxibenzotriazol en dimetilformamida como medio de reacción durante 20 minutos. Después de cada paso de síntesis, el grupo Fmoc se escindió con piperidina al 20% en dimetilformamida en 20 minutos.

35

40

La liberación del péptido de la resina de síntesis y la escisión de los grupos de protección lábiles con ácido - con excepción del grupo de protección fenilacetilo - tuvo lugar con 20 ml de ácido trifluoracético, 0,5 ml de etanoditiol, 1 ml de tioanisol, 1,5 g de fenol y 1 ml de agua en 40 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la solución de reacción se mezcló con 300 ml de diisopropiléter enfriado y para la completa precipitación del péptido se mantuvo 40 minutos a 0°C. El precipitado se separó por filtración, se lavó con diisopropiléter, se disolvió con ácido acético inferior al 50% y se liofilizó. El material bruto obtenido se purificó mediante HPLC preparativa con material Delta-PAK RP C-18 (columna 50 x 300 mm, 100 Å, 15 μ) mediante los correspondientes gradientes (eluyente A: agua, 0,1% de ácido trifluoracético, Eluyente B: acetonitrilo, 0,1% de ácido trifluoracético) en aproximadamente 120 minutos. La identidad del material eluido se comprobó mediante espectrometría de masas con plasma iónico.

45

50

La introducción de un marcado con hapteno, p. ej., un marcado con digoxigenina o respectivamente con digoxina tuvo lugar mediante copulación del correspondiente derivado de éster activo, p. ej., éster de digoxigenin-3-carboximetil-éter-N-hidroxisuccinimida (Boehringer Mannheim GmbH, Mann-heim, Alemania) en los grupos amino libres del péptido en solución. El péptido a derivatizar se disolvió en una mezcla de DMSO y tampón de fosfato de potasio 0,1 M pH 8,5. A continuación, se añadieron gota a gota, 2 equivalentes de éster activo por función amino primario libre disuelto en un poco de DMSO, y se agitó a temperatura ambiente.

El curso de la conversión fue seguido mediante HPLC analítica. El producto se purificó mediante HPLC preparativa.

55

El derivado de lisina K1 se empleó para las posiciones en las cuales no debía tener lugar ningún marcado con hapteno. El derivado de lisina K2 se empleó para las posiciones en las cuales debía tener lugar un marcado con hapteno. El derivado de lisina K3 se empleó para la copulación del grupo ε-amino en el péptido en la región espaciadora.

60

Si el péptido contenía todavía lisina protegida con fenilacetilo, se escindió este grupo de protección en el último paso enzimáticamente con penicilina G amidasa en un medio acuoso con una parte de disolvente orgánico a temperatura ambiente. La enzima se separó por filtración y el péptido se purificó mediante HPLC preparativa. La identidad del material eluido se comprobó mediante espectrometría de masas con plasma iónico.

65

La introducción de un grupo de marcado con rutenio, tuvo lugar o bien en el terminal N mediante un derivado de rutenio(bispiridil)<sub>3</sub> - ácido carboxílico (BPRu-COOH), p. ej., Ru-(bispiridil)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-N-hidroxisuccinimid-éster, ó bien en la secuencia mediante un radical lisina K4 ε-derivatizado (Fmoc-Lys(BPRu)OH).

## ES 2 268 694 T3

La introducción de un marcado de biotina tuvo lugar o bien en el terminal N mediante una derivatización en resina (biotina-éster activo), o bien dentro de la secuencia análogamente a la introducción de un marcado de rutenio mediante la correspondiente lisina  $\epsilon$ -derivatizada con biotina.

5 La síntesis de péptidos multímeros ramificados tuvo lugar análogamente a la síntesis de los péptidos lineales. Como fase sólida se escogió en este caso una resina poco cargada, p. ej., con una carga de 0,2 mmoles/g. Para el ramificado se empleó un ácido diaminocarboxílico protegido con bis-Fmoc, como por ejemplo el Fmoc-Lys(Fmoc)-OH.

En las tablas 2 y 3 figura un listado de péptidos obtenidos.

10 A partir de las regiones gp120, gp41 y gp32 de HIV I ó respectivamente HIV II, se obtuvieron los compuestos péptidos representados en la tabla 2a-2d.

TABLA 2a

*Péptidos lineales activados con -SH*

gp41/1	CUZU-WGIRQLRARLLALETLLQN
gp41/2	CUZU-LSLWGCKGKLV CYTS
gp41/4	CUZU-ALETLLQNQQLLSLW
gp120	CUZU-IDIQEMRIGPMAWYS

TABLA 2b

*Péptidos lineales marcados con digoxigenina*

gp120	Digoxigenin-3-cme-UZU-NNTRKSISIGPGRAFYT Digoxigenin-3-cme-UZ-NTTRSISIGPGRIFY Digoxigenin-3-cme-UZU-IDIQEERRMRIGPGMAWYS
gp41/1	Digoxigenin-3-cme-UZU-AVERYLKDQQLLGIW Digoxigenin-3-cme-ZUZU-AVERYLKDQQLLGIW Digoxigenin-3-cme-UZ-QARILAVERYLKDQQLLGIWGASG Digoxigenin-3-cme-ZGGGG-QARILAVERYLKDQQLLGIWGASG Digoxigenin-3-cme-UZU-WGIRQLRARLLALETLLQN
gp41/2	Digoxigenin-3-cme-UZU-LGIWGCSGKLICTTAV LGIWGCSGK-(cme-3-Digoxigenin)-LICTTAV Digoxigenin-3-cme-UZU-LGIWGCSGK-(cme-3-Digoxigenin)-LICTTAV Digoxigenin-3-cme-ZU-GCSGKLICTTAVPWNASWS GCSGK-(cme-3-Digoxigenin)-LICTTAVPWNASWS GCSGKLICTTAVPWNASWSK(cme-3-Digoxigenin)G Digoxigenin-3-cme-UZU-LSLWGCKGKLV CYTS
gp41/3	Digoxigenin-3-cme-UZU-KDQQLLGIWGSSGKL
gp41/4	Digoxigenin-3-cme-UZU-ALETLLQNQQLLSLW
gp32	Digoxigenin-3-cme-Z-NSWGCAFRQVCHTT

ES 2 268 694 T3

TABLA 2c

*Péptidos lineales rutenilados*

5

10

15

20

25

30

gp120	BPRu-UZU-NNTRKSISIGPGRAFYT BPRu-UZ-NTTRSISIGPGRAFY BPRu(ethylenglykol)-UZ-NTTRSISIGPGRAFY NNTRKSISIGPGRAFYT-K(BPRu) BPRu-UZU-IDIQEERRMRIGPGMAWYS
gp41/1	BPRu-UZU-AVERYLKDQQLLGIW BPRu-UGGG-QARILAVERYLKDQQLLGIWGASG BPRu-GGGG-QARILAVERYLKDQQLLGIWGASG BPRu-UZU-WGIRQLRARLLALETLLQN
gp41/2	BPRu-UZU-LGIWGCSGKLICTTAV BPRu-UGGG-GCSGKLICTTAVPWNASWS (GCSGKLICTTAVPWNASWS)K-(BPRu)
gp41/3	BPRu-UZU-KDQQLLGIWGSSGKL
gp41/4	BPRu-UZU-ALETLLQNQQLLSLW
gp32	BPRu-UZU-NSWGCAFRQVCHTT BPRu-GGG-QAQLNSWGCAFRQVCHTTVPWPNDSLT

35

TABLA 2d

*Péptidos ramificados*

40

45

gp120	(NTTRSISIGPGRAFY-AbuZ AbuZ) <sub>2</sub> -K-Z-AbuZ-K-(Bi) ((NTTRSISIGPGRAFY-ZU) <sub>2</sub> -K-UU-K-(Bi) ((NNTRKSISIGPGRAFYT-UZU-K) <sub>2</sub> -UZU- NNTRKSISIGPGRAFYT-UZU-K) <sub>2</sub> -UZU-Bi
gp120	(NTTRSISIGPGRAFY-ZU) <sub>2</sub> -K-UU-K-(BPRu)

50

A partir de la región NS5, la región NS4, la región del núcleo y la región NS3 del HCV, se sintetizaron los péptidos representados en las siguientes tablas 3a-d.

55

TABLA 3a

*Péptidos lineales activados con -SH*

60

NS4/3	C-UZ-SRGNHVSPTHYVPESDAA
-------	-------------------------

65

ES 2 268 694 T3

TABLA 3b

*Péptidos lineales marcados con un hapteno*

NS5/1	Digoxigenin-3-cme-UZU-SRRFAQALPVWARPD
Core2m	Digoxigenin-3-cme-U-PQDVKFPGGGQIVGGV
NS4/1	Digoxigenin-3-cme-UU-Nle-EEASQHLPYIEQ
NS4/2	Digoxigenin-3-cme-UU-QKALGLLQT
NS4/3	Digoxigenin-3-cme-UZU-SRGNHVSPHYVPESDAA
Core1	Digoxigenin-3-cme-UZU-KNKRNTNRR
Core1+2	Digoxigenin-3-cme-U-PQRKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGW
NS 3/1	Digoxigenin-3-cme-UZ-AWYELTPAETTVRLRAYNQVTPGLPV

TABLA 3c

*Péptidos lineales rutenilados*

Core1	BPRu-GGGG-KNKRNTNRR
Core1+2	BPRu-UZU-KNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGV
NS4/1+2	BPRu-UZ-SQHLPYIEQG-NleNle-LAEQFKQQALGLLQT
NS4/3m	BPRu-UZ-SRGNHVSPHYVPESDAA
NS5/1	BPRu-UZ-SRRFAQALPVWARPD
Core1+2+3	BPRu-UZ-KNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVLLPRR
Core1m	BPRu-UZ-NPKPQKKNKRNTNRR
Core3m	BPRu-UZ-GQIVGGVYLLPRRGPRLG
Core2m	BPRu-UZ-PQDVKFPGGGQIVGGV
NS4/3m-l	BPRu-UZU-SRGNHVSPHYVPESDAA
NS4/1	BPRu-UZU-SQHLPYIEQ

TABLA 3d

*Péptidos ramificados*

NS4/3m	(SRGNHVSPHYVPESDAA-UU) <sub>2</sub> KUUK (BPRu) (SRGNHVSPTRYVPESDAA-UU) <sub>4</sub> K <sub>2</sub> KUUK (BPRu) (SRGNHVSPHYVPESDAA-UU) <sub>8</sub> K <sub>4</sub> U <sub>4</sub> K <sub>2</sub> KUUK (BPRu) (SRGNHVSPHYVPESDAA-UU) <sub>2</sub> KUUK (Z-Bi) (SRGNHVSPHYVPESDAA-UU) <sub>4</sub> K <sub>2</sub> KUUK (Z-Bi) (SRGNHVSPHYVPESDAA-UU) <sub>8</sub> K <sub>4</sub> U <sub>4</sub> K <sub>2</sub> KUUK (Z-Bi)
--------	---

## ES 2 268 694 T3

### Ejemplo 2

#### *Obtención de antígenos multímeros unidos a un soporte (polihaptenos) con epítomos de péptido*

5 Los correspondientes péptidos se obtuvieron con una función mercapto reactiva, p. ej., mediante la introducción de una cisteína adicional (comparar tablas 2a y 2b). El péptido puede modificarse o bien en el terminal N, o bien en el terminal C ó también a voluntad en la secuencia con un llamado empalme. La síntesis del péptido correspondiente tuvo lugar como se ha descrito en el ejemplo 1.

10 Para la reacción de obtención del polihapteno, el soporte conteniendo grupos  $-NH_2$  se carga primeramente con el correspondiente éster activo de los grupos de marcado y a continuación con grupos maleinimidoalquilo, mediante tratamiento de preferencia con maleinimidohehexil- (MSH) ó maleinimidopropil-N-hidroxisuccinimidéster (MPS). Mediante esto, se marcaron parcialmente los grupos amino primarios en el soporte (p. ej., cadenas laterales  $\epsilon$ -amino de radicales de lisina), y por otra parte se convirtieron en grupos maleinimido.

15 La reacción del soporte con los ésteres activos se efectuó de preferencia en 0,1 moles/litro de tampón de fosfato de potasio pH 7,0-8,5 y una concentración de 5-20 mg/ml durante 2-4 horas a temperatura ambiente. Los componentes de molécula pequeña se separaron, o bien mediante diálisis o bien por cromatografía sobre gel (gel AcA 202, eluyente 0,1 moles/litro de tampón de fosfato de potasio pH 7-8,5).

20 En otro paso, el péptido o la mezcla de péptidos se copularon con la función mercapto reactiva en el soporte marcado modificado con MHS-, en 0,1 moles/litro de tampón de fosfato de potasio pH 8,5 durante 6 horas a temperatura ambiente. El péptido sin reaccionar fue separado, o bien mediante diálisis o bien mediante cromatografía sobre gel.

25 Cuando el marcado debe efectuarse directamente en el péptido, el polihapteno debe sintetizarse análogamente y se introduce un péptido activado con  $-SH$ , correspondientemente marcado.

30 Como soporte se utilizó IgG de conejo, albúmina de suero bovino,  $\beta$ -galactosidasa, aminodextrano y fragmentos del anticuerpo Fab de bovino. La carga del soporte con las secuencias de péptido fue de 1:2 - 1:20 sobre una base molar. La carga del soporte con grupos de marcado fue de 1:1 a 1:20 sobre una base molar.

### Ejemplo 3

#### *Obtención de antígenos multímeros (polihaptenos) unidos al soporte, con epítomos de polipéptidos en el ejemplo de poli-p24-RSA-BPRU*

##### 1. Principio

40 Se hizo reaccionar albúmina de suero bovino (RSA) con rutenio-(bis-piridil) $_2^{2+}$ -N-hidroxisuccinimidéster (BPRU) y maleinimidohehexanoil-N-hidroxi-succinimidéster (MHS) en el orden indicado y para la separación de los reactivos de derivatización libres no unidos, se dializó en cada caso.

45 Se hizo reaccionar el antígeno p24 recombinante de *E. coli* (Ghrayeb y Chang, DNA5 (1986), 93-99) con la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1, con el N-succinimidil-S-acetiltiopropionato (SATP) para la introducción de radicales tiol mediante grupos amino y para la separación del SATP libre no unido, se dializó.

50 Después de la liberación de los grupos  $-SH$  en antígenos p24 activados, se copularon a las funciones maleinimido de RSA-BPRU. Los grupos funcionales de copulación sobrantes se captaron con cisteína y N-metilmaleinimida, con lo cual la reacción se interrumpió.

A partir de la mezcla de reacción, se aisló a continuación el producto mediante cromatografía con Sephacryl S 200.

##### 2.1 Obtención de la RSA (MH)-BPRU

55 A 250 mg de RSA se añadió a una concentración de proteína de 20 mg/ml en tampón PBS pH 8,0 un sobrante 5 veces molar de reactivo BPRU (0,4 ml de solución en stock de BPRU con 47 mg/ml en DMSO).

60 Después de la adición se continuó agitando durante 75 minutos a 25°C. La reacción se interrumpió a continuación mediante la adición de lisina a una concentración final de 10 mmoles/litro, y se continuó agitando durante 30 minutos a 25°C.

Mediante la adición de yodoacetamida a una concentración final de 10 mmoles/litro, se derivatizaron los grupos  $-SH$  presentes del RSA. Para ello se continuó agitando la mezcla durante 45 minutos a 25°C y pH 8,0.

65 Los reactivos de la derivatización libres no unidos, se separaron completamente mediante diálisis (20 horas, 4°C) frente a un volumen 500 veces mayor de tampón PBS pH 7,5 (50 moles/litro de fosfato Na, 150 mmoles/litro de NaCl, pH 7,5).

## ES 2 268 694 T3

La incorporación de BPRU fue de 4,7 moles por mol de RSA. El rendimiento fue de 220 mg de RSA-BPRU (89%).

5 A 220 mg de RSA-BPRU se añadió, a una concentración de proteína de 20 mg/ml en tampón PBS pH 7,1, un exceso 25 veces molar de reactivo MHS (0,5 ml de solución en stock de MHS con 50 mg/ml en DMSO) y se continuó agitando durante 60 minutos a 25°C.

La reacción se interrumpió mediante la adición de lisina a una concentración final de 10 mmoles/litro y se continuó agitando durante 30 minutos a 25°C.

10 El reactivo MHS libre no unido, se separó completamente mediante diálisis (20 horas, 4°C frente a un volumen 500 veces mayor de tampón PBS pH 7,5. Rendimiento: 210 mg de RSA(MH)-BPRU (84%).

### 2.2 Obtención del antígeno p24 (SATP)

15 A 100 mg de antígeno p24 se añadió, a una concentración de proteína de 10 mg/ml en fosfato de Na 0,1 M, 0,1% (p/v) de SDS a pH 7,1 un exceso 3 veces molar de reactivo SATP (0,06 ml de solución en stock de SATP con 35 mg/ml en DMSO), y se continuó agitando durante 60 minutos a 25°C.

20 La reacción se interrumpió a continuación mediante la adición de lisina a 10 mmoles/litro de concentración final y se continuó agitando a 25°C durante 30 minutos.

25 El reactivo SATP libre, no unido, se separó a continuación, completamente, mediante diálisis (20 horas, a temperatura ambiente), frente a un volumen 500 veces mayor de fosfato de Na 0,1 moles/litro, 0,1% (p/v) de SDS, pH 6,5. Rendimiento: 95 mg de antígeno p24 (SATP) (95%).

### 2.3 Obtención del poli-antígeno p24-RSA-BPRU

30 A 95 mg de antígeno p24 (SATP) se añadieron 10 mg/ml en fosfato de Na 0,1 moles/litro, 0,1% (p/v) de SDS, pH 7,5 de hidroxilamina (1 mol/litro; Merck) a 30 mmoles/litro de concentración final, y la mezcla se continuó agitando a 25°C durante 60 minutos.

35 Se añadieron 18 mg de RSA(MH)-BPRU y la mezcla a una concentración de proteína de 9 mg/ml continuó agitando durante 60 minutos (pH 7,1; 25°C). Para la interrupción se añadió cisteína a una concentración final de 2 mmoles/litro y continuó agitándose durante 30 minutos a pH 7,1. A continuación, se añadió N-metilmaleimida (Sigma) a una concentración final de 5 mmoles/litro y se agitó otros 30 minutos a pH 7,1 y 25°C.

40 La mezcla así paralizada se dializó durante 18 horas a temperatura ambiente (RT) frente a un volumen 500 veces mayor de fosfato de Na 0,1 mol/litro, 0,1% (p/v) de SDS, pH 6,5, y se purificó mediante una columna de Sephacryl S 200 (Pharmacia). Marco de condiciones más importantes para la función de la columna: volumen de la columna 340 ml, volumen de aplicación 12 ml, velocidad de flujo 13,0 cm/hora, tampón de trabajo 0,1 mol/litro de fosfato de Na, 0,1% (p/v) de SDS, pH 6,5, temperatura de trabajo RT.

45 El curso de la columna se siguió mediante un fotómetro de flujo a una longitud de onda de 280 nm y se recogió en fracciones (tamaño de fracción aproximadamente 0,5% del volumen de la columna).

Las fracciones del perfil de elución de alto peso molecular, se reunieron según el registro UV en un conjunto, el producto se concentró en una célula Amicon con agitación, con membrana YM30 (Amicon), a una concentración de proteína de 10 mg/ml y se congeló a -80°C.

50 Incorporación: 5 moles de antígeno p24 por mol de antígeno p24 - RSA-BPRU. Rendimiento: 19 mg.

### Ejemplo 4

#### Mejora de la sensibilidad del formato del ensayo puente utilizando antígenos multímeros

55

##### a) antígenos multímeros unidos al soporte (polihaptenos)

60 Se emplearon diferentes variantes de polihaptenos biotinilados en un inmunoensayo de antígeno doble en combinación con un hapteno monómero digoxigenilado, con iguales cantidades molares de hapteno biotinilado o respectivamente, digoxigenilado. Como epítipo se empleó la secuencia de aminoácidos NNTRKSSISIGPGRIFYT de la región gp120 del HIV. La obtención del hapteno se efectuó como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2. Se normalizó la reactividad relativa de sueros anti-HIV nativos con los diferentes polihaptenos biotinilados, a la reactividad de los sueros con el correspondiente hapteno monómero biotinilado (=100% de reactividad).

65 Los resultados de esta prueba están representados en la tabla 4.

## ES 2 268 694 T3

Molécula soporte	Carga efectiva por molécula de soporte		Reactividad: Comparación con el antígeno monómero (= 100 %)
	Biotina	Péptido	
RSA (p.m. 69000)	1	4,2	aprox. 173,0 %
(aprox. 627 Aa)	1	5,1	aprox. 185,0 %
$\beta$ -Gal (p.m. 465000)	1	2,2	aprox. 123,5 %
(aprox 4227 Aa)	1	3,6	aprox. 151,8 %
	1	9,4	aprox. 125,0 %
Fab bovino (p. m. 75000)	1	5,9	aprox. 146,0 %
(aprox. 682 Aa)			

### b) Antígenos ramificados multímeros

Se efectuó una comparación de antígenos biotinilados y rutenilados con epítomos ramificados monómeros o respectivamente multímeros en un inmunoensayo de antígeno doble en el formato del ensayo puente.

En un epítomo de la región NS4 del HCV (secuencia SRGNHVSPTHYVPESDAA), se comparó la combinación de un antígeno monómero biotinilado y un antígeno monómero rutenilado con la combinación de un antígeno multímero biotinilado ramificado (ver tabla 3d, línea 2) y un antígeno monómero rutenilado en un ensayo puente. Se determinó la diferenciación de la señal, es decir, la relación de la señal de medida entre muestras positivas y negativas. Una diferenciación más alta de la señal significa una mejor sensibilidad. En el empleo de un antígeno multímero biotinilado se obtuvo una diferenciación de la señal de 386 frente a una diferenciación de la señal de únicamente 208 en la combinación de ambos antígenos monómeros.

En correspondencia, se efectuó un ensayo puente de doble antígeno con una secuencia de antígeno a partir de la región gp120 del HIV. El epítomo empleado tenía la secuencia de aminoácidos NTTRSISIGPGRAFY. Se comparó la combinación de un antígeno monómero biotinilado y un antígeno monómero rutenilado con la combinación de un antígeno multímero biotinilado ramificado (ver tabla 2d, línea 2) y un antígeno multímero rutenilado (ver tabla 2d, línea 4). En un ensayo con la combinación de ambos antígenos multímeros se encontró una diferenciación de la señal entre muestras positivas y negativas, de 12. La combinación de ambos antígenos monómeros mostró por el contrario una diferenciación de la señal únicamente de 10.

### Ejemplo 5

*Mejora de la sensibilidad del formato del ensayo puente con el empleo de antígenos multímeros unidos al soporte*

Se investigó la combinación de un monómero biotinilado y un antígeno monómero rutenilado con la combinación de un antígeno monómero biotinilado y un antígeno multímero unido al soporte rutenilado (molécula soporte): albúmina de suero bovino; epítomo: antígeno p24 de HIV; obtención según ejemplo 3) y con la combinación de un antígeno multímero unido al soporte biotinilado y un antígeno monómero rutenilado en un ensayo puente. En el caso de dos diferentes muestras positivas (sueros de HIV) se encontró en la combinación de los dos antígenos monómeros en cada caso, una diferenciación de la señal positiva/negativa de 2, mientras que la combinación de antígeno monómero biotinilado y antígeno multímero rutenilado dió una diferenciación de 19 ó respectivamente 7 y la combinación del antígeno multímero biotinilado y el antígeno monómero rutenilado dió una diferenciación de 4 ó respectivamente 3.

También en el empleo de una combinación de un antígeno monómero biotinilado y otro antígeno multímero rutenilado (molécula soporte: inmunoglobulina de conejo) se encontró en las tres diferentes muestras positivas una diferenciación de la señal positiva/negativa esencialmente mayor de 3,22 ó respectivamente 10 frente a 2,9 ó respectivamente 8 en una combinación de los antígenos monómeros.

También en el empleo de otro epítomo (proteína de la región gp41 del HIV) pudo demostrarse la superioridad de los antígenos multímeros frente a los antígenos monómeros. Mientras en una combinación de antígenos monómeros biotinilados y digoxigenilados en el ensayo puente prácticamente no se encontró ninguna diferenciación entre negativo y positivo, la combinación de polihaptenos multímeros demostró una muy buena diferenciación.

## ES 2 268 694 T3

### Ejemplo 6

#### *Mejora de la sensibilidad del formato del ensayo puente con el empleo de antígenos multímeros*

5 En particular, se prefiere la combinación del antígeno monómero lateral y el antígeno multímero marcado para alcanzar una sensibilidad óptima en un amplio margen de concentración en inmunoglobulina específica. Las cantidades de empleo preferidas son 1 equivalente de epítipo lateral por 0,2 - 10 y en particular por 0,2 - 8 equivalentes de epítipo marcado.

10 La figura 2 muestra una comparación de la combinación de un antígeno monómero biotinilado y un antígeno monómero rutenilado en una relación de epítipos 1:1 (curva 1) y de la combinación de un antígeno monómero biotinilado y un antígeno multímero rutenilado unido al soporte en una relación de epítipos de 1:2 (curva 2) ó respectivamente 1:4 (curva 3).

15 Como epítipo se empleó la secuencia dada en el ejemplo 4a, de la región gp120 del HIV. La molécula soporte del antígeno multímero fue RSA. La carga del soporte se efectuó con los grupos epítipos 5:1 y con los grupos BPRu 3:1, en cada caso sobre una base molar.

20 De la figura 2 se desprende que el empleo de antígenos multímeros conduce a una disminución del efecto Hook y a un aumento general de la sensibilidad.

### Ejemplo 7

#### *Mejora de la sensibilidad del formato del ensayo puente con el empleo de antígenos multímeros mediante el aumento del número de grupos de marcado*

30 Otra mejora de la sensibilidad del ensayo se logra porque es posible un aumento en gran escala del número de grupos de marcado o respectivamente del número de grupos de unión a la fase sólida, sin enmascarar las regiones epítipo o sin aumentar los valores ocultos no específicos mediante el aumento de la hidrofobicidad.

35 Se compararon antígenos multímeros digoxigenilados, los cuales contenían epítipos de la región gp129 del HIV (comparar con el ejemplo 4b) copulados sobre un soporte de fragmento del anticuerpo Fab bovino. La carga del soporte con el epítipo péptido estuvo cada vez en el margen de 1:6 a 1:7 sobre una base molar. La carga del soporte con grupos digoxigenina fue de 1:2 ó respectivamente 1:4.

40 Los resultados de esta prueba están resumidos en la tabla 5. De la misma se desprende que con el aumento del número de grupos de marcado se logró una mejora no lineal de la sensibilidad y una elevada disminución del efecto Hook.

TABLA 5

Muestra	Estequiometría. Soporte: Dig. 1:4	Estequiometría. Soporte: Dig 1:2
Dinámica de la región de medición. Etapas de dilución	mE	mE
1/16384	36	148
1/8192	48	159
1/4096	49	151
1/2048	82	158
1/1024	132	159
1/512	302	157
1/256	675	164
1/128	1503	190
1/64	3493	259
1/32	7436	480
1/16	9306	1066
1/8	9449	3036
1/4	9449	3378
1/2	9449	2694
sin diluir	9474	2266

## ES 2 268 694 T3

### Ejemplo 8

#### *Mejora de la estabilidad con el empleo de antígenos multímeros*

5 Se ensayó la estabilidad de antígenos monómeros y multímeros. Para ello se determinó la reproducción de la señal incubando a 35°C durante tres días, con referencia a la intensidad original de la señal.

10 Para un antígeno monómero rutenilado de la región gp120 del HIV (secuencia ver ejemplo 4) se determinó en combinación con un antígeno monómero biotinilado recién preparado, una reproducción de la señal de 3,0 ó respectivamente 4,0% en dos muestras. Con el empleo de un antígeno multímero rutenilado unido al soporte (soporte: IgG de conejo, 4 grupos de marcado y epítomos por molécula de soporte) se determinaron en las mismas condiciones de ensayo las reproducciones de la señal de 73,1 ó respectivamente 73,6.

15 De manera correspondiente se investigó un antígeno monómero biotinilado con la misma secuencia epítomo con un antígeno multímero biotinilado unido al soporte (soporte: IgG de conejo, 18 grupos biotinilados y 3 epítomos por soporte) en combinación con un antígeno monómero rutenilado. Para el antígeno monómero biotinilado se determinaron reproducciones de la señal de 25,0 ó respectivamente 37,0% y para el antígeno multímero, reproducciones de la señal de 120,3 ó respectivamente 79,9%.

### 20 Ejemplo 9

#### *Mejora de la sensibilidad con respecto a la sensibilidad con antígenos de escasa afinidad*

25 De preferencia, se emplearon antígenos multímeros para el reconocimiento de inmunoglobulina específica con escasa afinidad, p. ej., en una conversión de suero efectuada recientemente y en nuevos subtipos víricos.

##### *a) Antígenos multímeros rutenilados*

30 Se investigó la diferenciación de la señal positiva/negativa con el empleo de antígenos con una secuencia epítomo de la región NS4/3 del HCV. La combinación de un antígeno monómero rutenilado y un antígeno monómero biotinilado dio como resultado en dos diferentes muestras positivas de conversión de suero, una diferenciación de la señal positiva/negativa de 3 ó respectivamente 1, es decir, una muestra positiva no fue reconocida como tal. Con el empleo de antígenos multímeros unidos a un soporte de IgG biotinilados y antígenos rutenilados, se encontró una diferenciación de la señal de 21 en cada caso. Solamente con el empleo de antígenos multímeros pudieron clasificarse correctamente las muestras positivas.

##### *b) Antígenos multímeros biotinilados y digoxigenilados*

40 Se compararon el epítomo péptido igual en cada caso, a partir de la región gp41 del HIV (gp41/3), como antígeno multímero unido al soporte, y como antígeno monómero. Se emplearon cada vez 50 ng/ml de péptido monómero biotinilado y monómero digoxigenilado. En los antígenos multímeros se emplearon 50 ng/ml del “equivalente del péptido”, en donde la cantidad de péptido se calculó sobre el grado de carga del polihapteno. El ensayo se efectuó con el aparato automático de análisis ES700.

45 Los ensayos se efectuaron con el empleo de diferentes paneles de conversión de suero como muestras. La figura 3 muestra que los paneles en los ensayos con el empleo del polihapteno digoxigenilado fueron clasificados correctamente como positivos, mientras que con el empleo del antígeno monómero se obtuvo un resultado falsamente negativo.

50 El índice “cut off” (“índice de separación”) es el límite entre la valoración negativa y positiva de un experimento. Se define como 2 veces el valor del control negativo.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación inmunológica de un anticuerpo específico en un líquido de muestra según el procedimiento del ensayo puente, en el cual el líquido de muestra se incuba en presencia de una fase sólida con dos antígenos dirigidos contra el anticuerpo a determinar, en donde el primer antígeno lleva por lo menos un grupo de marcado y el segundo antígeno (a) está unido a la fase sólida ó (b) está en una forma capaz de unirse con la fase sólida, y el anticuerpo a determinar se detecta por determinación del grupo de marcado en la fase sólida o/y en la fase líquida,

**caracterizado** porque

por lo menos uno de los dos antígenos comprende varias regiones epítopo iguales, sintética o recombinantemente obtenidas, las cuales reaccionan con el anticuerpo a determinar.

2. Procedimiento según la reivindicación 1,

**caracterizado** porque

el primer antígeno, marcado, comprende varias regiones epítopo.

3. Procedimiento según la reivindicación 1,

**caracterizado** porque

el segundo antígeno, lateral de la fase sólida, comprende varias regiones epítopo.

4. Procedimiento según la reivindicación 1,

**caracterizado** porque

el primer antígeno marcado, y el segundo antígeno lateral de la fase sólida, comprenden varias regiones epítopo.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4,

**caracterizado** porque

se emplea un antígeno que no contiene ningún soporte que reacciona con el anticuerpo a determinar, al cual están copuladas covalentemente varias regiones epítopo.

6. Procedimiento según la reivindicación 5,

**caracterizado** porque

se emplea un antígeno de fórmula general:



ó



en donde T significa un soporte, P significa secuencias peptídicas o polipeptídicas, las cuales son iguales o diferentes, contienen regiones epítopo inmunológicamente reactivas y están copuladas covalentemente al soporte, y L significa grupos de marcado o para la unión a grupos idóneos de una fase sólida, los cuales están copulados covalentemente al soporte o respectivamente a las secuencias peptídicas o polipeptídicas, n es un número mayor de 1 hasta 40, y m es un número de 1 a 10.

7. Procedimiento según la reivindicación 6,

**caracterizado** porque

P significa secuencias peptídicas sintéticas con una longitud de 6 a 50 aminoácidos, las cuales junto a las regiones epítopo comprenden todavía eventualmente regiones espaciadoras inmunológicamente inactivas.

## ES 2 268 694 T3

8. Procedimiento según la reivindicación 6,

**caracterizado** porque

5 P significa secuencias polipeptídicas recombinantes con una longitud de hasta 1000 aminoácidos.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4,

**caracterizado** porque

10 se emplea un antígeno, el cual comprende varias regiones epítipo copuladas covalentemente entre sí directamente o mediante regiones espaciadoras.

10. Procedimiento según la reivindicación 9,

15 **caracterizado** porque

se emplea un antígeno con la fórmula general (II):

20 
$$P^1 \{P^2 [P^3 (P^4)_{t,s}]_r\} \quad (II)$$

en donde  $P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$  y  $P^4$  significan secuencias peptídicas con una longitud de hasta 50 aminoácidos, en donde por lo menos 2 secuencias peptídicas iguales o diferentes contienen regiones epítipo inmunológicamente reactivas,  $r$  es 1 ó 2,  $s$  es un número entero de 0 a 4 y  $t$  es un número entero de 0 a 8, en donde el antígeno contiene por lo menos un lugar de ramificación y por lo menos un grupo de marcado o un grupo capaz de unión a una fase sólida.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4,

30 **caracterizado** porque

se emplea un antígeno, el cual comprende varias regiones epítipo, un polipéptido de fusión recombinante, cuya secuencia de aminoácidos comprende varias regiones epítipo inmunológicamente reactivas, las cuales pueden estar ligadas mediante regiones espaciadoras inmunológicamente inactivas.

35 12. Reactivo para la determinación inmunológica de un anticuerpo específico en un líquido de muestra según el procedimiento del ensayo puente,

el cual comprende

40 una fase sólida reactiva,

dos antígenos dirigidos contra los anticuerpos a determinar, en donde el primer antígeno lleva un grupo de marcado, y el segundo antígeno (a) está unido a la fase sólida o (b) está en una forma capaz de unirse a la fase sólida,

45 **caracterizado** porque

por lo menos uno de los dos antígenos comprende varias regiones epítipo iguales, obtenidas sintéticamente o recombinantemente, las cuales reaccionan con el anticuerpo a determinar.

50

55

60

65

Figura 1

Secuencia rec p24

1	MTMITPSLAA	GPDKGNSSQV	SONYPIVQNL	QQQMVHQAIS	PRTLNAVVKV	IEEKAFSPEV
	pUCB (12aa)	p17 (12aa)	--)	p24 (231aa)		
61	IPMFSALSEG	ATPQDLNTML	NTVGGHQAAAM	QMLKETINEE	AAEWRVHPV	HAGPIAPGQM
121	REPRGSDIAG	TTSTLQEIQIG	WMTNPPPIP	GEIYKRWILL	GLNKIVRMYS	PVSILDIRQG
181	PKEPFRDYVD	RFYKTLRAEQ	ASQEVKNWMT	ETLLVQNANP	DCKTILKALG	PAATLEEMMT
241	ACQGVGGPFGH	KARVLAEAMS	QVTSATIMM	QRGNFRNQKK	TVKCFNCGKE	GHIKNCRAP
		{--	p15 (72aa)			
301	RKKGCWKCGK	EGHQMKDCTE	RQANFLGN			

Empalme (1aa)

Figura 2

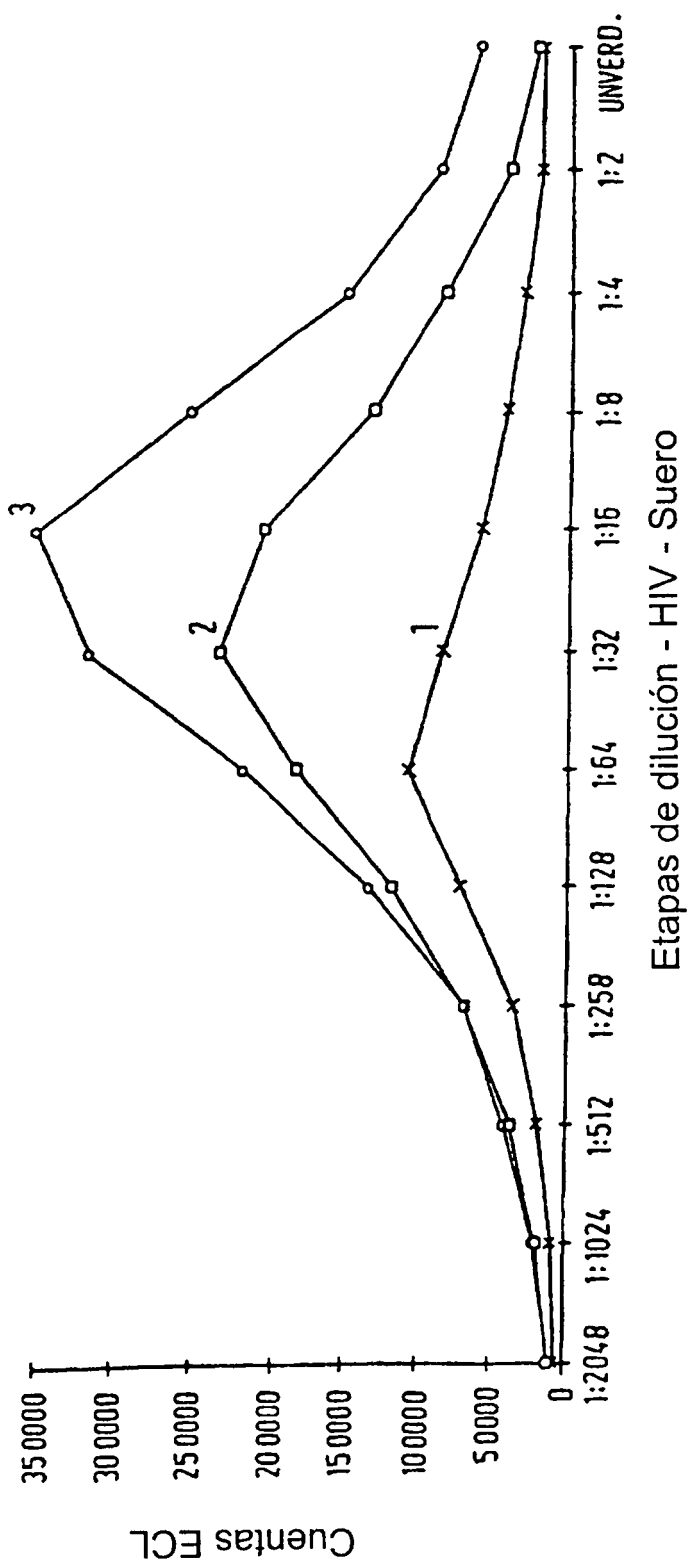
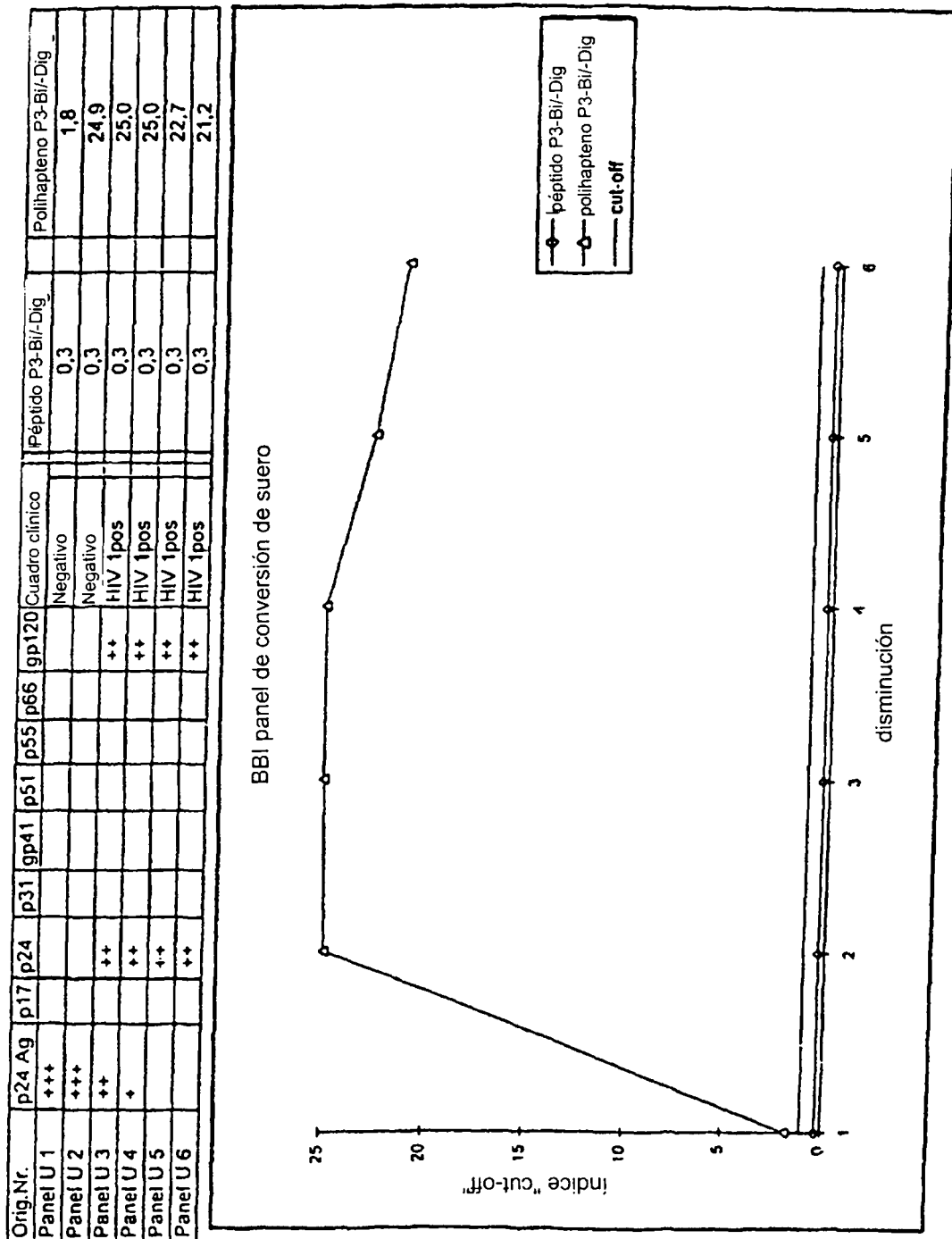


Figura 3



# ES 2 268 694 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) ANUNCIANTE:
- (A) NOMBRE: Boehringer Mannheim GmbH
  - (B) CALLE: Sandhofer Str. 116
  - (C) CIUDAD: Mannheim
  - 10 (E) PAÍS: Alemania
  - (F) CÓDIGO POSTAL: 68305
- 15 (ii) TÍTULO DEL ANUNCIO: Determinación de la inmunoglobulina específica mediante el empleo de antígenos múltiples
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 17
- (iv) FORMA DE LECTURA DEL ORDENADOR:
- 20 (A) SOPORTE DE DATOS: disquette
  - (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - 25 (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25 (EPA)

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 17 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:
- 40 (A) ORGANISMO: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
- (viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:
- (A) CROMOSOMA/SEGMENTO: gp120
- 45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Asn | Thr | Arg | Lys | Ser | Ile | Ser | Ile | Gly | Pro | Gly | Arg | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |
|     | Phe | Tyr | Thr |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 50  | 15  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 16 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - 60 (C) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- 65 (vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

## ES 2 268 694 T3

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: gp120

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

5

Asn Thr Thr Arg Ser Ile Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe  
1 5 10

10

Tyr Thr  
15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

15

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

25

(A) ORGANISMO: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

(B) CEPA: Subtipo 0

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

30

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: gp120

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

35

Ile Asp Ile Gln Glu Glu Arg Arg Met Arg Ile Gly Pro Gly  
1 5 10

Met Ala Trp Tyr Ser  
15

40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

45

(A) LONGITUD: 24 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

50

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

55

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: gp41

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

60

Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln  
1 5 10

Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Ala Ser Gly  
15 20

65

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

## ES 2 268 694 T3

(A) LONGITUD: 23 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

10

(A) ORGANISMO: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: gp41

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr  
1 5 10

20

Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser  
15 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

30

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

35

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

40

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: gp41

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

45

Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Ser Ser Gly Lys Leu  
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

50

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

60

(A) ORGANISMO: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

(B) CEPA: SUBTIPO 0

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

65

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: gp41

## ES 2 268 694 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Ser Leu Trp  
1 5 10 15

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

10

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

20

(A) ORGANISMO: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

(B) CEPA: Subtipo 0

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

25

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: gp41

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

Leu Ser Leu Trp Gly Cys Lys Gly Lys Leu Val Cys Tyr Thr Ser  
1 5 10 15

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

35

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

45

(A) ORGANISMO: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

(B) CEPA: subtipo 0

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

50

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: gp41

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

Trp Gly Ile Arg Gln Leu Arg Ala Arg Leu Leu Ala Leu Glu  
1 5 10  
Thr Leu Leu Gln Asn  
15

55

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 aminoácidos

65

(E) TIPO: aminoácido

(F) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

## ES 2 268 694 T3

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

(B) CEPA: subtipo 0

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: gp32

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

Gln Ala Gln Leu Asn Ser Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val  
1 5 10

Cys His Thr Thr Val Pro Trp Pro Asn Asp Ser Leu Thr  
15 20 25

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus de la hepatitis C

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: NS5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp  
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus de la hepatitis C

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: núcleo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
1 5 10

Gly Val  
15

## ES 2 268 694 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: virus de la hepatitis C

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

- (A) CROMOSOMA/SEGMENTO: NS4

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

Glu Glu Ala Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln  
1                      5                                      10

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: virus de la hepatitis C

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

- (A) CROMOSOMA/SEGMENTO: NS4

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr  
1                      5

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: virus de la hepatitis C

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

- (A) CROMOSOMA/SEGMENTO: NS4

## ES 2 268 694 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu  
1 5 10  
5 Ser Asp Ala Ala  
15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 16:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

20 (vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus de la hepatitis C

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

25 (A) CROMOSOMA/SEGMENTO: núcleo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

30 Pro Gln Arg Lys Asn Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln  
1 5 10  
Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val  
15 20 25

35 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

40 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

45 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus de la hepatitis C

50 (viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: NS3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

55 Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu  
1 5 10  
Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val  
15 20 25  
60  
65