



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 255 068**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **96112414 .6**

96 Fecha de presentación : **28.10.1991**

97 Número de publicación de la solicitud: **0770679**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.1997**

54

Título: **Péptidos específicos para VHC, sus agentes y su utilización.**

30

Prioridad: **03.11.1990 DE 4034982**
19.04.1991 DE 4112743
19.06.1991 DE 4120281
28.06.1991 DE 4121431

45

Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.06.2006**

45

Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **03.08.2010**

45

Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **03.08.2010**

73

Titular/es:
Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Gorzhauser Hof Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE

72

Inventor/es: **Krupka, Udo;**
Stüber, Werner;
Gerken, Manfred y
Brust, Stefan

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 255 068 T5

DESCRIPCIÓN

Péptidos específicos para VHC, sus agentes y su utilización.

5 La presente invención comprende polipéptidos para la determinación inmunoquímica de anticuerpos específicos contra VHC y antígenos VHC, así como los agentes adecuados para dicho procedimiento y su utilización.

La presente invención también comprende un procedimiento inmunoquímico para la detección simultánea y/o la determinación simultánea de múltiples diferentes especificidades de anticuerpos contra, respectivamente, diferentes patógenos, en una sola prueba.

15 La hepatitis no A/no B (HNANB) es considerada enfermedad transmisible o grupo de generadores de enfermedad asociada a virus y puede ser diferenciada de otros generadores de enfermedad inducidos por virus, provocados por diferentes virus de hepatitis, como el virus de la hepatitis A (VHA), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis D (VHD) y el virus de la hepatitis E (VHE). Finalmente, también se pueden diagnosticar como hepatitis aquellas provocadas por citomegalovirus (VCM) o el virus Epstein Barr (VEB).

20 Sobre la base de relevamientos epidemiológicos se puede definir, acorde a la vía de transmisión, al menos dos hepatitis no A/no B (HNANB): el virus de hepatitis epidémica (enterically transmitted NANBV o VNANB transmitido por vía entérica), transmitido por agua y alimentos, así como el virus de hepatitis postransfusión (blood transmitted NANBV VNANB transmitido por sangre), transmitido por sangre, inyecciones o vías similares. Además de estas vías de infección, también se conocen transmisiones que, como VNANB de aparición esporádica ("community acquired NANBV" o VNANB adquirido por la comunidad) no presentan una pertenencia evidente a ninguno de los dos tipos mencionados. A pesar de que se desconoce la cifra exacta de agentes o virus que provocan una HNANB, el denominado virus de hepatitis C (VHC) fue identificado recientemente como generador de dicha enfermedad (WO 89/04 669).

25 Hasta hace no mucho tiempo, un diagnóstico clínico se basaba, principalmente, en la determinación serológica de antígenos y/o anticuerpos correspondientes, asimismo, las pruebas son específicas para parámetros del grupo de los generadores de hepatitis VHA, VHB, VHD, VHE, VCM o VEB. En el caso de los denominados procesos de exclusión sólo se diagnosticaba una HNANB si las determinaciones mencionadas eran todas negativas.

30 Asimismo, también se utilizaban los denominados marcadores indirectos, por ejemplo, GPT (Glutamato-Piruvato-Transaminasa (transaminasa glutámico-pirúvica), también denominada ALT, Alanin Aminotransferasa (alanina aminotransferasa)) o Anti HBc (anticuerpos específicos del núcleo de hepatitis B). Estos elementos auxiliares, sin embargo, no son lo suficientemente sensibles ni específicos para poder ser considerados confiables. En el caso de análisis de donantes, inclusive, sólo puede evitarse una pequeña parte de hepatitis post-transfusión, que se presenta en, aproximadamente, 10% de los pacientes transfundidos. La urgencia de incorporar pruebas específicas se subraya debido al hecho de que para aproximadamente 90% de las hepatitis post-transfusión se considera responsable el VNANB. El problema principal de esta afección consiste en el hecho de que entre el 25 y el 55% de los infectados padece de daños hepáticos crónicos.

35 Con el descubrimiento del VHC se logró una base para una nueva detección específica de VHC, es decir, de anticuerpos específicos contra el VHC. El aislamiento y la caracterización del VHC o de las correspondientes réplicas de cADN de partes del genoma de VHC, es objeto de la memoria WO 89/04 669, en la cual se realiza la clasificación del VHC en la familia de los virus similares a flavivirus. En dicho documento también se describe la utilización de antígenos VHC para detectar los anticuerpos específicos contra VHC, así como la generación de anticuerpos para la determinación diagnóstica de antígenos en la sangre del paciente. Sin embargo, se utilizan proteínas obtenidas mediante tecnología genética, especialmente, proteínas no estructurales (NSP) de la región de marco de lectura abierto (open reading frame region o ORF), que se utilizan como reactivos en el procedimiento inmunoquímico de detección.

40 Se reúnen bajo detección inmunoquímica, en el sentido de la presente invención, todos los procedimientos, como métodos *in vitro* homogéneos (en solución) o heterogéneos (con fase sólida), que permiten la determinación de antígenos y anticuerpos de las clases de inmunoglobulina A, D, E, G o M (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) en los líquidos corporales como suero, plasma, saliva, líquido cefalorraquídeo u orina. Ejemplos de dichos procedimientos también llamados ensayos de inmunidad son el ensayo inmunoenzimático (ELISA o EIA), ensayo radioinmune (RIA), ensayo de inmunofluorescencia (IFA), radioinmunoprecipitación (RIPA), difusión de gel de Agar, etc.

45 Para detectar los anticuerpos específicos de VHC (anti-VHC), en la memoria WO 89/04 669 se utilizó, por ejemplo, el antígeno C-100-3 mencionado, en la realización ELISA. El constructo C100-3 expresado en células de levadura de la zona de NSP 3/4 comprende 363 secuencias de aminoácidos, cuya secuencia está representada en la figura 1, asimismo, el sistema de numeración corresponde al de la memoria mencionada.

50 Sin embargo, la sensibilidad máxima que se puede obtener con el procedimiento ELISA en la determinación de anti-VHC en muestras de origen humano se considera, en el caso de pacientes crónicos de NANB, en, aproximadamente, un 80% y en el caso de pacientes agudos de NANB, en, aproximadamente, un 30%. Estos resultados en sangre humana de pacientes se corroboran con los correspondientes análisis en chimpancés infectados con VNANB.

ES 2 255 068 T5

En ese caso, se logra una detección positiva de anti-VHC a base del constructo C-100-3 tan sólo aproximadamente 6-18 semanas tras el aumento de ALT, lo cual se puede observar como síntoma de enfermedad 3-10 semanas tras la inoculación del NANBV. De este modo, se obtiene un periodo de 9-26 semanas tras la infección de un chimpancé como lapso total hasta que el ensayo de inmunidad acorde al estado actual de la técnica se puedan detectar, con el constructo C-100-3, los anticuerpos específicos de VHC.

En la memoria WO 90/11 089 se describen otras secuencias de aminoácidos del VHC que pueden ser utilizadas para la detección de anti-VHC. Sin embargo, no se mencionan segmentos de proteínas determinados para la relevancia del diagnóstico ni se encuentran ejemplos de epítomos inmundominantes.

El principal problema que aún persiste en la determinación de anti-VHC de los procedimientos conocidos por la literatura son las pruebas que ofrecen una reacción falsa-positiva y falsa-negativa. Las pruebas falsas-positivas, sin embargo, pueden ser de hasta el 40% en el grupo de los donantes sanos de sangre (WEINER A., *et al.* Lancet 1990, Vol. 336, página 695). En virtud de la falta de una prueba específica y sensible de VHC, se desecha erróneamente una cantidad no desconsiderable de pruebas de falsa reacción en el marco de la donación de sangre y, al mismo tiempo, aún no se determinan de manera fiable los pacientes realmente positivos de VHC.

Para eliminar estos inconvenientes se seleccionaron, de otros grupos de trabajo, determinadas secuencias de la región ORF de C-100-3 (de la memoria WO 89/04 669, figura 1) y se emplearon a un ensayo de inmunidad (péptidos sp42, 117, 67 y 65, figura 2). En el análisis de chimpancés infectados con NANB no se pudo obtener una mejora de la importancia diagnóstica. Las observaciones efectuadas, a su vez, llevaron a la conclusión de que ninguno de los péptidos descritos es adecuado como base para una determinación fiable de IgG o IgM, dado que la sensibilidad es insuficiente y el periodo de ventana para el diagnóstico es de, al menos, 7 a 17 semanas hasta que la detección de los anticuerpos no significa una reducción en comparación con los métodos convencionales de detección. Por otro lado, se descubrió que, sobre todo el sp42 con un periodo de ventana de 20 a 40 semanas, no es adecuado para una prueba de diagnóstico (SAFFORD J., *et al.* Int. Symp. on Viral Hepatitis and Liver Disease 1990 Houston, EEUU).

El polipéptido denominado sp67, sin embargo, sería inmunodominante, a pesar de que con dicho péptido solamente fue posible una determinación del 86% de muestras anti-VHC positivas (DAWSON, G.J., *et al.* Int. Congress of Virology 1990, Berlín, FRG).

Se habría alcanzado una mejora con los péptidos del núcleo obtenidos sintéticamente (OKAMOTO H., *et al.* Japan. J. Exp. Med. 1990, vol. 60, n° 4, páginas 223-233). A su vez, mediante criterios de predicción físico-químicos según HOPP y WOOD (Proc. Nat. Acad. Sci. 1981, vol. 78, páginas 3824-3828) se seleccionó una secuencia entre los, en total, 3 puntos de unión potenciales de anticuerpos de la secuencia de aminoácidos del núcleo 1-120 (OKAMOTO, H. *et al.*, Japan. J. Exp. Med. 1990, vol 60, n° 3, páginas 167-177) Este péptido representado en la figura 3 comprende 36 aminoácidos de la numeración n° 39 a n° 74.

En contraposición a la prueba anti C-100, con un ELISA basado en estos péptidos del núcleo se logró una detección de anticuerpos de VHC en algunos sueros anti-VHC positivos.

Este hallazgo fue confirmado por un análisis comparativo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, o PCR) para detectar el ARN del VHC.

Sin embargo, precisamente las 26 muestras determinadas como anti-núcleo de VHC positivas (4,3%) en el análisis de los 606 donantes de sangre explican que sólo 10 (1,65%) casos pudieron ser detectados mediante PCR. A la inversa, 16 donantes (2,65%) tuvieron una falsa reacción positiva con dicho péptido. Aunque el péptido del núcleo mencionado, para un procedimiento de detección anti-VHC, en algunos casos sería más adecuado que la prueba anti C-100, en general, con el péptido del núcleo del estado actual de la técnica están vinculadas notables propensiones a perturbaciones.

La presente invención tiene como objetivo desarrollar una prueba con la cual se puedan detectar infecciones de VHC en lo posible, de manera temprana, y con una elevada especificidad. Sorprendentemente, se descubrió que determinados polipéptidos del área de la región ORF de C-100-3 y/o del área amino-terminal de la región del núcleo de VHC son especialmente adecuados para la detección de anticuerpos específicos de VHC y se puede obtener un incremento notable de la sensibilidad en comparación con los péptidos del estado actual de la técnica con, al mismo tiempo, una propensión significativamente más reducida a perturbaciones debido a reacciones positivas falsas indeseadas.

Además, se descubrió que con los péptidos acordes a la invención se alcanza una concentración elevada de antígenos y, con ello, una elevada densidad de epítomos en un procedimiento inmunoquímico de detección. Esto es posible, especialmente, cuando debido a la ausencia de contaminaciones perturbadoras se hace posible el análisis de muestras muy concentradas de pacientes.

También fue muy sorprendente que los péptidos publicado portaran epítomos inmunodominantes para anticuerpos de VHC tempranos y tardíos y por tanto se pudieran implementar de manera especialmente ventajosa para estudios en serie.

ES 2 255 068 T5

Son, por ello, objeto de la invención, las mezclas de péptidos que reaccionan específicamente con anticuerpos contra una infección de VHC, asimismo, sus secuencias de aminoácidos contienen partes de la región ORF de C-100-3 y/o de la región del núcleo de VHC aminoterminales y cuyas secuencias corresponden a las siguiente fórmula:

5
121 4083: 175
SGKPAIIPDREVLVYREFDEMEEC SQHLPYIEQGM LAEQFKQKALGLLQTASRQA

10 Asimismo, los péptidos utilizados para la preparación de mezclas de péptidos acordes a la invención comprenden partes de la región del núcleo de VHC aminoterminales, a saber, el siguiente péptido con la siguiente secuencia:

15 1 30 SP 10
MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQI

20 Con los péptidos de la región del núcleo pueden detectarse tanto anticuerpos tempranos de fases infecciosas agudas como así también anticuerpos tardíos, lo cual mejora notablemente la sensibilidad de las detecciones basadas en estos péptidos respecto del estado actual de la técnica. Otra ventaja es la elevada especificidad de los péptidos, lo cual, en general, conduce a una cifra mínima de muestras de falsa reacción positiva.

25 En general es ventajoso utilizar péptidos, péptidos enlazados o mezclas de péptidos específicos para anticuerpos de VHC tempranos y tardíos, dado que con ambos tipos de puntos de unión se pueden detectar tanto muestras de fases infecciosas tempranas como así también muestras de fases infecciosas tardías. También pueden detectarse de manera segura las seroconversiones originadas por anticuerpos IgG y/o IgM específicos de VHC, y es posible, en general, la discriminación de muestras positivas y negativas con una extraordinaria precisión de separación. Asimismo, en general no hay interferencias por el sistema de expresión necesario para una representación, acorde a la tecnología genética,
30 de la proteína u otras contaminaciones inevitables de la célula huésped en el cultivo de virus. También se garantiza, generalmente, una determinación segura de anticuerpos específicos de VHC en sueros, plasmas de citrato, heparina y EDTA de origen humano y una inactivación de las muestras durante, aproximadamente, 60 minutos a, aproximadamente, 56°C generalmente no provoca falsos resultados positivos. Finalmente, con estos péptidos acordes a la invención pueden obtenerse anticuerpos específicos mediante los cuales, gracias a la determinación inmunológica de los
35 correspondientes antígenos en la sangre libre de células del paciente, se puede reducir aún más el periodo de ventana.

40 En este caso se describe una mezcla de péptidos que, preferentemente, detectan anticuerpos específicos de VHC de pacientes convalecientes o infectados de manera crónica y/o anticuerpos de VHC de fases infecciones agudas y se describen polipéptidos así como mezclas, acordes a la invención, de péptidos adecuados como base de pruebas de rastreo para la detección sin diferenciación, pero de alta sensibilidad y baja propensión a perturbaciones, de anticuerpos anti-VHC.

45 También se describen anticuerpos que presentan una afinidad bioespecífica con, al menos, uno de los péptidos descritos de la región ORF de C-100-3 o de la región del núcleo.

A través de la determinación inmunológica de los correspondientes antígenos con los anticuerpos descritos en sangre libre de células del paciente se puede detectar la presencia de VHC ya antes de la presencia de anticuerpos del propio cuerpo.

50 Otro objeto de la invención, es un procedimiento inmunológico para detectar y/o determinar anticuerpos de VHC, con mezclas de péptidos acordes a la invención a modo de antígenos.

También es objeto de la invención la utilización de las mezclas de péptidos acordes a la invención para generar anticuerpos en mamíferos, especialmente, en seres humanos.

55 Otro objeto de la invención también son, por ello, los agentes que contienen las mezclas de péptidos o anticuerpos acordes a la invención solos o en combinación con otros péptidos o anticuerpos.

Otro objeto de la invención son procedimientos para la preparación de un agente para la utilización como inmunógeno, para generar anticuerpos en mamíferos, especialmente, en seres humanos.

60 Los péptidos inmunoreactivos mencionados pueden ser obtenidos sintéticamente o según la técnica genética, preferentemente, sintéticamente, según procedimientos conocidos por el especialista.

65 La síntesis química de los péptidos puede obtenerse, por ejemplo, según BARANI, G. y MERRIFIELD, R.B. en "The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology" (Los péptidos, análisis, síntesis y biología), vol. 2, Academic Press 1980, Ed. Erhard Gross, Johannes Meyenhofer, especialmente, como un polipéptido o como mezcla de múltiples péptidos menores con secuencia de aminoácidos superpuesta o no superpuesta.

ES 2 255 068 T5

Entre los polipéptidos obtenidos por tecnología genética también se encuentran proteínas de fusión cuya proporción de fusión se disocia posteriormente. También se encuentran entre ellos los polipéptidos que eventualmente fueron modificados por glicosilación, acetilación o fosforilización.

5 Las secuencias de aminoácidos pueden ser sintetizadas tanto como un polipéptido o como mezcla de múltiples péptidos menores con secuencia de aminoácidos superpuesta o no superpuesta.

También se descubrió que para una detección inmunoquímica de anti-VHC, las mezclas de péptidos individuales pueden presentar mejores características de diagnóstico que péptidos individuales de las estructuras mencionadas. Es especialmente ventajoso utilizar mezclas de péptidos de la región ORF de C-100-3 y de la región del núcleo.

Un objeto de la invención son, por ello, las mezclas de péptidos que contienen uno o múltiples de los péptidos descritos.

15 En otro modo de ejecución, se enlazan ambos péptidos mencionados con o sin puente. Inclusive pueden obtenerse formas polímeras de dos o más péptidos según métodos conocidos por el especialista, o ser unidos a un portador, por ejemplo, partícula de látex o proteína. Por ejemplo, son especialmente adecuados como portadores o puentes, por ejemplo, albumina de suero y/o polilisina humanas. Igualmente, los péptidos pueden ser modificados mediante una prolongación con 1 a 40, preferentemente, 1 a 20, especialmente, 1 a 10 aminoácidos. Las áreas y estructuras adicionales pueden influir positivamente en el comportamiento fisicoquímico de todo el péptido, asimismo, se desea conservar la reactividad inmune de los péptidos o de partes de ello.

También se describen péptidos enlazados entre sí, con o sin puente, o en un portador.

25 Tales modificaciones cambian generalmente la adsorción pasiva o la cualidad aglutinante a la fase sólida, influyen ventajosamente en el procedimiento de acoplamiento o actúan de manera más intensa como antígeno durante la generación de anticuerpos policlonales o monoclonales orientados contra los péptidos.

A menudo es ventajoso que los péptidos sean derivatizados múltiples veces, como, por ejemplo, por asociación aminoterminal o carboxiterminal de uno o múltiples aminoácidos, preferentemente, cisteína, para lograr, por ejemplo, el enlace de péptidos entre sí o a un portador, amidación de ácido tioglicólico, amización carboxiterminal, por ejemplo, con amonio o metilamina. Dichas modificaciones pueden modificar la carga neta del polipéptido y mejorar las características fisicoquímicas del péptido o facilitar el enlace covalente del péptido en un portador fijo, en proteínas transportadoras o en otro péptido. El especialista también sabe que los péptidos descritos también pueden ser preparados entre sí, o consigo mismos, mediante la tecnología genética o sintéticamente, de tal manera que múltiples epítopos inmunorelevantes se encuentren sobre un péptido.

Además se describen péptidos para la preparación de mezclas de péptidos acordes a la invención con una secuencia de aminoácidos modificada por el reemplazo de uno o múltiples aminoácidos.

En general, tales modificaciones no provocan el cambio directo de la reactividad inmune de un péptido, sin embargo, pueden obtenerse características inmunológicas mejoradas de los péptidos. Por ejemplo, la metionina tiende a la oxidación espontánea, lo cual puede evitarse por el intercambio por norleucina, sin que se modifiquen esencialmente las características antígenas del polipéptido.

Es de conocimiento del especialista que determinadas secuencias de aminoácidos pueden ser sometidas a diferentes modificaciones, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones, con las cuales pueden estar vinculadas diferentes ventajas. Tales modificaciones afectan, por ejemplo, a las combinaciones como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; Phe, Tyr; Ala, Ser; Ala, Thr; Ala, Val; Ala, Pro; Ala, Glu; Leu, Gln; Gly, Phe; Ile, Ser e Ile, Met.

También puede ser ventajoso mejorar la característica de absorción del polipéptido en forma de la adición de una secuencia hidrófoba que comprende, aproximadamente, 2 a 20 aminoácidos hidrófobos, por ejemplo, Phe Ala Phe Ala Phe.

En general se reúnen bajo detección inmunoquímica todos los procedimientos que permiten, como métodos *in vitro* homogéneos (en solución) o heterogéneos (con fase sólida), la determinación de antígenos y anticuerpos. Ejemplos de los también denominados ensayos de inmunidad son el ensayo inmonoenzimático (ELISA o EIA), ensayo radioinmune (RIA), ensayo de unmunofluorescencia (IFA), radioinmunoprecipitación (RIPA), difusión de gel de Agar, etc.

Estos métodos numerosos y muy diferentes se diferencian en modos de ejecución especiales en el marcador utilizado para la detección o en el principio de medición (por ejemplo, fotométrico, radiométrico, visual o por comportamiento de agregación, de luz de dispersión o precipitación) y en las fases gaseosas. Es de conocimiento del especialista que aunque está muy difundida una separación de anticuerpos o antígenos libres o enlazados de muestras no es necesariamente obligatoria, como, por ejemplo, en los denominados ensayos. Se prefieren los ensayos de inmunidad heterogéneos, especialmente, los procedimientos ELISA heterogéneos.

ES 2 255 068 T5

El especialista sabe igualmente que el término “prueba de confirmación” sólo describe la utilización de un ensayo de inmunidad, de manera similar al de las pruebas por nombre denominadas procedimientos Dot sólo describen de qué manera se inmoviliza el antígeno.

5 En la detección de anticuerpos, un procedimiento inmunoquímico de detección requiere, durante el desarrollo, el contacto de la muestra con las secuencias de péptidos descritas para conformar, en un paso determinado del procedimiento respectivo, un complejo de antígenos y anticuerpos o para evitar la formación de los mismos en las pruebas de competición e inhibición, por adición de reactivos adecuados marcados.

10 En el procedimiento directo pueden ser puestos en contacto los anticuerpos con péptidos unidos a la fase sólida o con péptidos marcados o con ambos, asimismo, es irrelevante si el procedimiento subyacente se basa, como método de 1, 2 o más pasos, en el principio de la segunda prueba de anticuerpos o a la conformación de la prueba inmunométrica (emparedado o sándwich de doble antígeno) o bien con péptidos iguales o diferentes (o mezclas de péptidos) en la fase sólida y como reactivo líquido para la detección, así como en relación con anticuerpos específicos, denominados 15 de captura (por ejemplo, anti IgM) o reactivos de afinidad (por ejemplo, proteína A).

El enlace de los péptidos a la fase sólida puede llevarse a cabo de manera covalente, por adsorción o mediante anticuerpos específicos o métodos similares afines, por ejemplo, a través del complejo biotina/avidina, preferentemente, sin embargo, por adsorción.

20 Como material portante para la fase sólida son adecuados los plásticos como poliestireno, cloruro de polivinilo, poliamida y otros polímeros sintéticos, polímeros naturales como celulosa, así como polímeros naturales derivatizados como acetato de celulosa y nitrocelulosa, como así también vidrio, especialmente, fibras de vidrio. Se prefiere como material portante el poliestireno.

25 Los portadores pueden presentar la forma de esferas, barras, tubos y placas de microtitulación o presentarse en forma de suspensiones, por ejemplo, partículas de látex. Las formaciones planas como tiras de papel, plaquitas y membranas también son adecuadas. La superficie del portador puede ser tanto permeable como impermeable a soluciones acuosas.

30 Son portadores preferidos las esferas, tubos, cuencos, micropartículas, tiras de papel y membranas. Portadores especialmente preferidos son las placas de microtitulación, partículas de latex, esferas de poliestireno o partículas de atracción magnética.

35 La concentración de péptidos en el revestimiento del portador es, en general, de, aproximadamente, 0,01-20 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente, 0,01-10 $\mu\text{g/ml}$, de modo especialmente preferido, de 2-10 $\mu\text{g/ml}$. Es especialmente ventajosa la utilización de polipéptidos obtenidos sintéticamente, cuya pureza elevada e intensa antigenidad permite la utilización de cantidades mínimas de, por ejemplo, 0,01-2,0 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente, 0,1-0,5 $\mu\text{g/ml}$. La capacidad de aglutinación del portador, especialmente en la utilización de poliestireno, en general no es saturada, de modo que normalmente 40 puede ser revestido con múltiples polipéptidos diferentes, especialmente, con 2-5, sobre todo, con 3-4 polipéptidos diferentes, lo cual es especialmente ventajoso.

En la utilización de péptidos como derivados marcados para la detección, se pueden utilizar todas las técnicas de acoplamiento conocidas por el especialista. También pueden ser dispuestos procedimientos de varios pasos como, por ejemplo, complejos péptido-anticuerpo, en los cuales el anticuerpo porta la marcación, o sistemas muy refinados, por ejemplo, biotina/avidina con marcación de un reactivo.

45 Como marcador pueden utilizarse, por ejemplo, isotopos radioactivos, colorantes fluorescentes o quimioluminescentes. También pueden utilizarse como marcadores las enzimas que, por ejemplo, pueden ser detectadas por sistemas de sustrato cromógenos, luminógenos o fluorógenos o por sistemas postconectados de intensificadores, con una segunda enzima activada por la primera.

50 Preferentemente, se utilizan enzimas como marcadores, especialmente, fosfatasa alcalina y/o peroxidasa de rábano o quimioluminescentes, por ejemplo, ésteres de acridinio.

55 La marcación se lleva a cabo según procedimientos descritos en el estado actual de la técnica para los marcadores mencionados.

60 En el caso de la marcación de los anticuerpos con peroxidasas puede utilizarse la técnica según NAKANE *et al.*, 1974, J. Histochem. Cytochem. 22, 1084-1090, o un procedimiento acorde a ISHIKAWA *et al.*, 1983, J. Immunoassay 4, 209-327, en el cual los compañeros son enlazados con un reactivo heterobifuncional.

65 Además de este procedimiento, pueden utilizarse los péptidos para la sensibilización de superficies adecuadas como, por ejemplo, látex o eritrocitos, para medir automáticamente o visualmente modificaciones fisicoquímicas indicadas por anticuerpos específicos de péptidos, por ejemplo, precipitaciones, agregación o dispersión de luz. Se sabe que los péptidos también pueden ser utilizados no derivatizada para la inhibición de estos principios de medición, como así también los métodos mencionados anteriormente.

Para la detección de los antígenos pueden utilizarse procedimientos inmunodiagnósticos que se sirven de anticuerpos policlonales o monoclonales que se obtienen mediante péptidos acordes a la invención o sus derivados. Los modos de ejecución que se pueden utilizar para el procedimiento de detección son conocidos por el especialista y están caracterizados porque en un paso determinado se forman complejos de anticuerpo-antígeno o la formación de complejos es inhibida en el procedimiento de competición por adición de un antígeno marcado.

Para el establecimiento de una prueba de antígenos pueden utilizarse como fases sólidas, marcadores o principios de medición todas las posibilidades detalladas en la determinación correspondiente de anticuerpos, asimismo, son especialmente preferidos como método inmunoquímico el principio de competición y la técnica de sándwich de doble anticuerpo. A su vez, es irrelevante si los procedimientos se configuran como procedimiento de 1, 2 o 3 pasos. De esta manera, se pueden llevar a cabo procedimientos de múltiples pasos con anticuerpos de detección no marcados, determinados mediante otro anticuerpo orientado hacia ellos, correspondientemente marcado. Para la generación de los anticuerpos es ventajoso que los péptidos se modifiquen de manera tal que se mejore su característica inmunógena, como ocurre, por ejemplo, por acoplamiento en la albúmina de suero o keyhole limpet hemocyanin (proteína conjugada es hemocianina de lapa) (B.S. Schaffhausen in *Hybridoma Technologie in the Biosciences and Medicine*, ed. T.A. Springer, Plenum Press NY, London, 1985).

Por último, la presente invención también puede ser utilizada en la aplicación de un elemento inmunodiagnóstico que contiene la fase sólida y, en forma seca, una parte, o la cantidad total, de los reactivos requeridos, asimismo, también en este caso los nuevos péptidos se encuentran o bien en la fase sólida o en el reactivo de detección o en ambos y se efectúa una determinación de anticuerpos, una detección de antígenos o con combinaciones con otros análisis.

Una ventaja de los péptidos utilizados para las mezclas de péptidos acordes a la invención es que permiten una determinación fiable de anticuerpos de VHC. Asimismo, mediante dichos péptidos también se detectan anticuerpos tempranos de fases infecciosas agudas, lo cual mejora notablemente la sensibilidad de las detecciones basadas en dichos péptidos respecto del estado actual de la técnica, además, permite la diferenciación entre fases agudas por un lado y estadios crónicos o convalecientes por otro, cuando los péptidos son utilizados con los puntos de unión correspondientes para estos tipos de anticuerpos (anticuerpos tempranos o tardíos) separados entre sí en dos procedimientos diferenciados de prueba. Finalmente, se obtiene, como otra ventaja, la elevada especificidad de los péptidos de la presente invención, lo cual conduce a una minimización de la cantidad de muestras de falsa reacción positiva.

Teniendo en cuenta la seguridad viral en la donación de sangre por un lado y debido a los costos, por el otro, se desarrollaron las denominadas pruebas combinadas, que, disponibles desde 1989, posibilitan una detección simultánea, no diferenciada de anti-VIH 1 y anti-VIH 2 (K. Körner *et al.*, *Lab. Med.* 14, 159-161,1990). Este desarrollo fue posible debido a la elevada similitud que presentan ambos subtipos de VIH entre sí, que, adicionalmente pertenecen a la misma clase de virus. De esta manera, la determinación anti-VIH 1 en tales pruebas combinadas anti-VIH 1/2 se basa en una reactividad cruzada de anti-VIH 1 con antígenos VIH 2 (M. Busch *et al.*, *Transfusion* 30/2, 184-187, 1990), como así también a la inversa, la detección anti-VIH 2 es reforzada en las reacciones que se realizan de anti-VIH 2 con antígenos VIH 1. Con esta base, el establecimiento de una detección combinada de dos especificidades de anticuerpos se constituye como relativamente simple, si se utilizan antígenos emparentados o de estructura análoga. La detección de un generador de hepatitis no A no B, el denominado virus de hepatitis C (VHC), fue la condición para el establecimiento de la determinación de un anti-VHC acorde a la presente invención. A pesar de las mejoras vinculadas con ello, de las características de rendimiento de las pruebas de rastreo, con las pruebas modernas anti-VHC se presenta nuevamente el problema de que en el análisis de donantes individuales se originan gastos y costos adicionales elevados con las pruebas combinadas anti-VIH, por un lado, y las pruebas individuales anti-VHC, por el otro.

Todas las ejecuciones comerciales hasta ahora de la determinación anti-VHC, así como la mayoría de las pruebas combinadas anti-VIH se basan en polipéptidos VHC o VIH obtenidos por tecnología genética. Sin embargo, hasta ahora no se ha logrado determinar al mismo tiempo múltiples diferentes especificidades de anticuerpos en un sólo preparado de prueba, que contiene múltiples antígenos diferentes en una misma detección inmunoquímica, si no se pueden utilizar antígenos similares, dado que en el caso de VHC (flavivirus) y VIH (retrovirus) existen diferentes pertenencias a clases de virus. Como diferentes especificidades de anticuerpos se entienden, en este caso, anticuerpos que no presentan una reactividad cruzada entre sí, o cuya reactividad cruzada es muy reducida. Se presupone que una prueba de este tipo para la detección de, en total, tres especificidades de anticuerpos contra múltiples diferentes antígenos virales en cuanto a la sensibilidad y respecto de la propensión a perturbaciones (especificidad) es más bien desmejorada que las correspondientes características de la prueba individual respectiva, debido a las interacciones mutuas que provocan interferencias.

Sorprendentemente, se descubrió ahora que múltiples diferentes anticuerpos o especificidades de anticuerpos contra respectivamente, diferentes patógenos se pueden detectar inmunoquímicamente en una sola prueba, si los diferentes epítopos de los, respectivamente, diferentes patógenos están fijados en un portador.

Asimismo, con el procedimiento descrito se hallaron sensibilidades que corresponden, al menos, a las sensibilidades de las pruebas individuales. Por ejemplo, para anti-VIH 1/2 y anti-VHC para el procedimiento combinado acorde a la invención se determinaron características de sensibilidad que corresponden, al menos, a aquellas de las pruebas individuales.

ES 2 255 068 T5

Por ello fue sorprendente que con el procedimiento descrito se redujera la propensión a perturbaciones por falsas reacciones positivas indeseadas. Por ejemplo, en el caso de la evaluación de especificidad de una prueba acorde a la invención anti-VIH/anti-VHC, se obtuvo una especificidad mayor que la suma de ambas pruebas individuales, con la consecuencia de que, en total, se deben descartar menos donantes de sangre de manera errónea.

Por ello, también se describe un procedimiento inmunoquímico para detectar y/o para determinar múltiples diferentes especificidades de anticuerpos contra, respectivamente, diferentes patógenos, caracterizado porque uno o múltiples epítomos de los respectivos patógenos son fijados en un portador y la detección y/o determinación de los patógenos mencionados se realiza en una sola prueba.

Para determinadas cuestiones, como, por ejemplo, los estudios en serie, posiblemente es conveniente realizar la determinación no diferenciada, simultánea, de diferentes patógenos. Esto significa que entre los diferentes anticuerpos no se hacen diferencias, sino que se obtiene una respuesta afirmativa o una respuesta negativa (negativa para todas las especificidades de anticuerpos).

Eventualmente también es conveniente determinar de manera diferenciada la misma detección de anticuerpos. Esto es posible, sin más, en el marco del procedimiento descrito, por ejemplo, si en una prueba inmunométrica los antígenos utilizados se marcan de manera diferente, según la especificidad del virus, por ejemplo, antígenos VIH 1 con peroxidasas, antígenos VIH 2 con fosfatasa alcalina y antígenos VHC con β -galactosidasas. Entonces pueden determinarse, con diferentes sustratos de enzimas, las especificidades de anticuerpos enlazadas al mismo tiempo, sucesivamente o al mismo tiempo.

Una forma alternativa de diferenciación es la inhibición de una especificidad de anticuerpos a través de la adición adecuada del correspondiente antígeno a la muestra.

Por ello, se publica un procedimiento inmunoquímico para la detección simultánea y/o determinación simultánea de diferentes especificidades de anticuerpos, asimismo, la detección y/o determinación se efectúa de manera diferenciada o no diferenciada, preferentemente, de manera no diferenciada.

Se entiende por patógenos diferentes aquellos patógenos que están orientados contra los anticuerpos de diferente especificidad y, en general, sin reactividad cruzada o con reactividad cruzada muy reducida. Estos son, por ejemplo, VIH 1 + 2, VHC, VHTL I + II, VHB o *trepanoma pallidum*, preferentemente, VIH y VHC.

Es especialmente ventajoso fijar en un soporte fijo los antígenos de los patógenos mencionados, especialmente, de VIH 1, VIH 2 y VHC, que presentan una densidad o concentración elevadas en los puntos de unión (epítomos) de los correspondientes anticuerpos. De esta manera, se pueden detectar, por ejemplo, seroconversiones, es posible una discriminación de muestras positivas y negativas con una precisión de separación generalmente elevada, en general no se puede presentar una interferencia por el sistema de expresión requerido para una representación, acorde a la tecnología genética, de la proteína, en general no se encuentran otras contaminaciones inevitables de la célula huésped en el cultivo de virus, se garantiza, generalmente, una determinación segura de anticuerpos específicos de VHC en sueros, plasmas de citrato, heparina y EDTA de origen humano y una inactivación de las muestras durante, aproximadamente, 60 minutos a, aproximadamente, 56°C generalmente no provoca falsos resultados positivos.

Preferentemente, se utilizan los epítomos individuales y/o sus combinaciones, especialmente, de polipéptidos del VIH 1 y/o del VIH 2 y VHC, adecuados para la detección de alta sensibilidad de anti-VIH/anti-VHC, y, además, mezclas de polipéptidos adecuadas como base para una prueba de rastreo para una detección combinada de anticuerpos. Además, se publican, por ello, mezclas de polipéptidos de VIH 1 y/o VIH 2 y VHC.

Son especialmente preferidos los siguientes polipéptidos:

1. VIH 1 (sistema de numeración según Ratner *et al.*, Nature 1985, 313, 277-284):

IV Proteína transmembranal (gp 41): AS 580-AS 630

V Proteína de envoltura (gp 120): AS 490-AS 540

VI Proteína del núcleo (p 24): AS 240-AS 390

2. VIH 2 (sistema de numeración según Gyader *et al.*, Nature 1987, 326, 662-669):

VII Proteína transmembranal (gp 36): AS 570-AS 620

VIII Proteína de envoltura (gp 110): AS 480-AS 530

IX Proteína del núcleo (p 26): AS 230-AS 380

ES 2 255 068 T5

3. VHC (sistema de numeración según WO 89/04669 y WO 90/11089):

X Proteína no estructural 4 (NSP 4): AS 121-AS 175

5 XI Proteína no estructural 3 (NSP 3): AS 1-AS 265

XII Proteína estructural (del núcleo): AS 1-AS 80

10 Se prefieren, sobre todo, mezclas de los polipéptidos mencionados, especialmente, para una prueba de rastreo no diferencia anti-VIH/anti-VHC, asimismo, se describirán algunos a modo de ejemplo, sin limitar a ello las posibilidades imaginables:

XIII

15 gp 41 VIH 1

gp 36 VIH 2

NSP 3 VHC

20 XIV

gp 41 VIH 1

gp 36 VIH 2

25

NSP 4 VHC

núcleo VHC

30

XV

gp 41 VIH 1

gp 36 VIH 2

35

NSP 3 VHC

NSP 4 VHC

40

núcleo VHC

XVI

gp 41 VIH 1

45

p 24 VIH 1

gp 36 VIH 2

NSP 3 VHC

50

núcleo VHC

o

55

XVII

gp 41 VIH 1

p 24 VIH 1

60

gp 36 VIH 2

p 24 VIH 2

NSP 3 VHC

65

NSP 4 VHC

núcleo

ES 2 255 068 T5

En general, con las mezclas de péptidos mencionadas se logran características inmunológicas mejoradas para un uso diagnóstico.

Demonstraron ser especialmente adecuados los siguientes péptidos de VIH 1, VIH 2 y VHC:

XVIII SPH 9 (VIH 1, gp 41):

586 **620**
RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

XIX SPH 20 (VIH 2, gp 36):

578 **613**
RVTAIEKYLQDQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVNS

XX SP 4083 (VHC, NSP 4):

121 **175**
SGKPAIIPDREVLRYREFDEMEECSQHLPHYEQGMLAEQFKQKALGLLQTASRQA

o sus partes, por ejemplo

XXI una mezcla de SP 4060 y SP 4082 (VHC, NSP 4):

121 **139**
SGKPAIIPDREVLRYREFDE **SP 4060**

144 **175**
SQHLPHYEQGMLAEQFKQKALGLLQTASRQA **SP 4082**

XXII SP 10 (VHC, núcleo):

1 **30**
MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQI

y/o

XXIII SP 31 (VHC, núcleo):

8 **24**
QRKTKRNTNRRPQDVKFP-NH₂

También es posible integrar otros péptidos de otras áreas de proteínas de VIH 1, VIH 2 o VHC, en tanto estos péptidos sean inmunorelevante. De manera inversa, también puede ser ventajoso, por ejemplo, para cuestiones epidemiológicas, excluir un anticuerpo específico en la detección no diferenciada, omitiendo los péptidos correspondientes para, por ejemplo, con una mezcla de péptidos de VIH 1 y de VHC, determinar al mismo tiempo, solamente anti-VIH 1/anti-VHC y no, por ejemplo, anti VHB/anti-VIH 1/anti-VHC. También pueden ser derivatizados y modificados los péptidos no idénticos a VHC, por ejemplo, precisamente VIH, de manera análoga, como descrito anteriormente en el caso de los péptidos VHC.

ES 2 255 068 T5

Una ventaja fundamental del procedimiento descrito es que múltiples anticuerpos contra diferentes patógenos pueden ser detectados en una misma prueba y, a su vez, se alcanza una especificidad o sensibilidad tan elevada como en las pruebas individuales.

5 Figura 1 secuencia primaria de los aminoácidos de la región ORF de C-100-3 (de la memoria WO/89/04669)

Figura 2 comparación de las secuencias acordes a la invención, de las fórmulas I y II con péptidos conocidos de la región ORF de C-100-3

10 Figura 3 comparación de las secuencias acordes a la invención de la proteína del núcleo VHC con péptidos conocidos. Los siguientes ejemplos descritos presentan los modos de ejecución de la invención, pero no la limitan a ellos.

Ejemplo 1

15

Preparación de soluciones de péptidos y revestimiento de placas de microtitulación con dichos péptidos o mezclas de péptidos

A partir de soluciones originales de los péptidos acordes a la invención en 50% de ácido acético en agua destilada, 20 que contenían 1 a 10 mg de péptido/ml, se crearon series dobles de dilución en 0,10 M de carbonato de sodio de pH 9,6, es decir, una serie con las concentraciones 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,2; 0,1; 0,05 y 0,01 μg de péptido/ml. En el caso de mezclas de péptidos individuales se procedió de manera análoga, asimismo, las soluciones originales fueron mezcladas adicionalmente en proporciones muy diferentes, por ejemplo, 10:1 o 1:4, para obtener por dilución en 0,1 M de carbonato de sodio las concentraciones finales indicadas anteriormente, que, sin embargo, en el 25 caso de mezclas de múltiples péptidos los contienen en la misma concentración (en el caso de mezclas de 1:1) o en diferentes proporciones entre sí.

100 μl de cada una de las diluciones se dispusieron en, respectivamente, 16 pocillos de placas de microtitulación, tipo B de Nunc, Roskilde, Dinamarca. Las placas de prueba llenadas con las diluciones se mantuvieron durante 18 30 horas a 20°C, luego las soluciones fueron extraídas por aspiración de los pocillos y estos fueron lavados 3-4 veces con 300 μl de una solución de 10 g/l de albúmina de suero vacuno en solución fisiológica de sal común amortiguada con fosfato, (PBS, pH 7,4) mediante llenado y aspirado y las placas de prueba fueron secadas posteriormente con gel de sílice a 20°C.

35

Ejemplo 2

Preparación de un anticuerpo marcado con peroxidasa contra inmunoglobulina humana de la clase IgG (h-IgG) así como sustrato de TMD para la detección

40

Los anticuerpos contra h-IgG fueron generados acorde al método de KOEHLER y MILSTEIN para la representación de anticuerpos monoclonales (Nature 256, 495, 1975), asimismo, diferentes anticuerpos monoclonales con la misma especificidad de antígenos fueron identificados con los métodos descritos por STÄHLI *et al.* (J. of Immunological Methods 32, 297-304, 1980). Tras la limpieza gelcromatográfica y diálisis contra solución salina amortiguada por 45 fosfatos (PBS, pH 7,4) posteriormente, se convirtió el pool que contenía la fracción de anticuerpos monoclonales (4 mg de proteína/ml) con N-gama-maleimidobutililoxisuccinimida (GMBS), adquirido en Behring Diagnostics, como se describe en TANAMORI *et al.* (J. Immunol. Meth. 62, 123-131, 1983).

El cloruro de hidrógeno de 2-iminotiolano (Sigman, cat. n° I 6256) fue convertido con peroxidasa de rábano (POD), adquirido en Boehringer Mannheim, cat. n° 413470, como se describe en KING *et al.* (Biochem. 17, 1499-1506, 1978). A partir del compuesto conjugado de GMBS-IgG y del compuesto conjugado iminotiolano-POD se obtuvo el compuesto conjugado IgG-POD como se describe en TANAMORI *et al.* (ut *supra*).

La solución obtenida del producto conjugado IgG-POD presentaba una proporción de proteína de 360 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 55 La proporción entre el POD y IgG se determinó en 2.8. La solución se diluyó posteriormente en 500 ng/ml IgG-POD con una solución de 50 ml/l de suero de ternero fetal (FKS), 5 g/l de polioxietileno-(20)-sorbitano monalaurato ($R_{\text{Tween 20}}$) en PBS y obtuvo la denominación conjugado anti IgG/POD. Para la utilización en el ELISA se varió la siguiente dilución en tampones tris pH 7,4, que contienen 0,5% de $R_{\text{Tween 20}}$ (dilución entre 1:100 y 1:20.000), para obtener, de manera uniforme, una dilución final de 1:26 en tampones de conjugado, que contiene 0,1 M de 2-amino-60 2(hidroximetil) 1,3-propandiol (tris), 0,1 M de sal de sal común (NaCl) así como 0,1% de R_{Tween} pH 8,4. Acorde al anticuerpo policlonal representado en el estado actual de la técnica, del conejo, se efectuó la regulación para obtener asimismo una dilución de uso de 1 + 25.

Para detectar el conjugado de anti-IgG/POD se utilizó un sistema de sustrato o un preparado de sustrato que 65 contiene peróxido de hidrógeno y tetrametilbenzidina (TMB), obtenida a partir de dos soluciones originales. Solución original 1: El dihidrocloruro de TMB fue disuelto agitando una concentración de 5 g/l, es decir, de 16 mmol/l en agua bidestilada y se reguló con 5 de ácido clorhídrico normal hasta alcanzar un pH de 1,5. A esta solución se le agregó penicilina G, con agitación, en una concentración final de 200 mg/l, es decir, de 0,56 mmol/l.

ES 2 255 068 T5

Solución original 2: a 900 ml de agua bidestilada se agregaron 1,4 ml de ácido acético glacial, 1,5 ml de 1 normal de NaOH y 250 mg, es decir, 3 mmol de H₂O₂ como aducto de urea-peróxido de hidrógeno. Tras la disolución completa se completó con agua bidestilada hasta alcanzar 1 l.

- 5 Preparación de sustrato de TMB: Una parte en volumen de la solución original 1 y 10 partes de la solución original 2 fueron mezclados entre sí.

Ejemplo 3

10 *Estado de la técnica*

Por ejemplo, se utilizó un kit de prueba ELISA (HP1) adquirible en el mercado, en el cual se utiliza el constructo C-100-3 descrito en la memoria WO 89/04669, obtenido mediante tecnología genética en levadura. En el análisis de sueros y plasmas humanos se trabajó como se indica en el folleto adjunto del fabricante, por ejemplo, dilución de la muestra de 1:11 e incubación durante 1 h del suero, incubación de 1 h del conjugado anti humano IgG/POD así como del sistema de sustrato enzimático con o-fenilendiamina (OPD) como sustrato, medición fotométrica a 492 nm así como determinación del valor límite (al valor medio de los controles negativos se agrega un umbral de 0,40 E).

De manera análoga se trabajó con otro ELISA adquirible en el mercado (HP 2), que además del constructo C-100 contiene, adicionalmente, epítomos del área del núcleo así como del área NSP 3 (c33c), es decir, que en los análisis de muestras humanas se utiliza el kit de prueba original respetando todas las indicaciones del fabricante, como descrito anteriormente.

A diferencia de ello, en la determinación de anticuerpos específicos de VHC en suero o plasma de chimpancé se procedió con ambos productos comerciales de modo tal que se detectaron, los anticuerpos policlonales generados en un conejo, contra el IgG humano. Para ello, la fracción de IgG del antisuero de conejo se limpió como se describe en el ejemplo 2, se dializó y se marcó con peroxidasa (POD). La concentración final se obtuvo con una concentración aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el conjugado monoclonal a-IgG/POD, para configurar de manera segura los anticuerpos contra IgG humano para IgG de chimpancé, a través de reactividad cruzada validada con pruebas previas.

La determinación del valor límite tuvo que ser modificada, como se describe en las tablas 10 A-C, dado que los valores iniciales de todos los valores iniciales de todos los chimpancé ya presentaban valores superiores (véase tablas 10 A-C).

En el caso de la prueba combinada comparativa anti VIH 1 + 2 para la determinación no diferencial de anticuerpos VIH 1 y VIH 2 se trata de un producto comercializado (HP 3), basado en péptidos obtenidos sintéticamente de VIH 1 y VIH 2. También en el caso de dicha prueba se trabajó acorde al folleto adjunto del fabricante, por ejemplo, dilución de la muestra 1:2 e incubación durante 30 min. del suero, incubación de 30 min. del conjugado (anti humano IgG/POD) así como del sistema de sustrato enzimático con tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato, medición fotométrica a 450 nm así como determinación del valor límite (al valor medio de los controles negativos se agrega un umbral de 0,250).

Ejemplo 4

50 *Determinación de anticuerpos humanos de la inmunoglobulina de la clase G contra VHC en ELISA con los péptidos acordes a la invención*

55 50 μ l de suero o plasma fueron agregados a 50 μ l de tampón de muestras, que contiene 0,3 M de tris, 0,3 M de NaCl, 20% de Boviserin y 0,1% de R_{Tween} 20 en pocillos de placas de microtitulación, revestidas con péptidos o mezclas de péptidos, como ya ha sido descrito. Tras la incubación durante 30 minutos a 37°C, el contenido de los pocillos fue extraído por absorción y los pocillos fueron lavados cinco veces con tampón de lavado que contenía 1 g/l de R_{Tween} 20 en PBS. Luego se efectuó la adición de 100 μ l de conjugado diluido final a los pocillos, asimismo, se trabajó, preferentemente, con una dilución previa de 1:3000 en Tris, 0,5% de Tween 20 y una dilución final de 1:26 en tampón de conjugado. Tras una incubación durante 30 minutos a 37°C, el contenido de los pocillos fue extraído por absorción y los pocillos fueron nuevamente lavados cinco veces. Posteriormente, a cada pocillo se agregaron 100 μ l de preparación de sustrato TMB, se incubaron durante 30 minutos a 20-22°C y la incubación fue finalizada por adición de 100 μ l de ácido sulfúrico 1 normal. La extinción de la solución coloreada fue medida con una longitud de onda de 450 nm (E₄₅₀) contra un valor vacío de PBS.

65 Se catalogaron como anti-VHC positivas las muestras que generaron un E₄₅₀ mayor que 0,10, como en el valor límite de anti-VHC, las muestras cuyo E₄₅₀ se encontraba en el área de entre 0,05 a 0,10 y como anti-VHC-negativas aquellas muestras con un E₄₅₀ inferior a 0,05.

ES 2 255 068 T5

En la tabla 1 se reúnen los resultados obtenidos a partir de las determinaciones descritas en los ejemplos 1, 2 y 4, de muestras humanas, con el péptido acorde a la invención 4083, así como una mezcla de secuencias menores de la fórmula I. De manera análoga, los datos en la tabla 2 se obtuvieron con el péptido acorde a la invención SP 10, asimismo, los resultados de ambos ELISA se compararon con aquellos del HP 1 (ejemplo 3).

5

TABLA 1

10 *Resultados de la determinación de anti-VHC con un ELISA, que contiene el péptido 4083 así como una mezcla de péptidos menores en la fase sólida con muestras humanas*

		positivo con ELISA con péptidos		
		(2 µg 4083/ml)	(2 µg 4060/ml y 2 µg 4082/ml)	
		inicial positiva	nueva prueba, positiva	nueva prueba, positiva
Muestras anti-VHC-positivas (HP1)				
de Francia.	n=15	15	15	15
de Austria	n=17	17	17	17
de Alemania	n=20	20	20	20
de los EEUU	n=49	49	49	49
Total	n=101	101 ¹⁾	101 ¹⁾	101 ²⁾
sueros/plasmas pareados de donantes de sangre sanos				
n = 259 sueros		2	1	s.d.
muestras anti-VHC-positivas (HP1)				
n = 259 plasmas		1	0	s.d.

¹⁾ n = 97 muestras presentaban extinciones de >> 2,5 E de las cuales, en el caso de un valor límite de 0,10 E, resultaron relaciones de > 25

²⁾ n = 94 muestras presentaban extinciones de > 2,5 E. Sólo 4 o 7 muestras reaccionaron con mayor debilidad, pero con valores de E₄₅₀ entre 0,8 y 2,5 y un valor límite de 0,10 E aún ciertamente intensa.

45

50

55

60

65

ES 2 255 068 T5

TABLA 2

Resultados de la determinación de anti-VHC con un ELISA, que contiene el nuevo péptido SP 10 en la fase sólida con muestras humanas

Positivo con ELISA con péptidos (2 µg SP 10/ml)			
	muestras anti-VHC-positivas (HP1)	inicial positiva	nueva prueba, positiva
5			
10	de Francia n = 35	35	35
	de Austria n = 26	26	26
	de Alemania n = 29	29	29
	de los EEUU n = 53	53	53
15	Total 143	1431)	1431)
sueros/plasmas pareados de donantes de sangre sanos (véase la curva de distribución de donantes de sangre sanos de la figura 2)			
20	N = 500 sueros	0	0
	N = 500 plasmas	0	0
25	¹⁾ n = 142 muestras presentaban extinciones de > 2,5 E de las cuales, con un valor límite de 0,1 E, resultaron relaciones de >> 25; sólo una muestra reaccionó con un valor de 1,2 E más débil, pero seguía siendo notablemente más intensa que en los ELISA comerciales (HP 1).		

De las muestras humanas evaluadas, clasificadas como anti-VHC positivas con una prueba comercial (HP1), todas las muestras también fueron hallaras positivas con todos los ELISA basados en los péptidos acordes a la invención. A su vez, además de una muy buena coincidencia con los resultados de las pruebas comerciales (HP1) se presenta una formación de señal muy intensa de los ELISA utilizando péptidos. Al mismo tiempo, los resultados de los análisis en serie de donantes sanos dejaron ver que la propensión a perturbaciones de las pruebas es extremadamente reducida. En la evaluación de donantes sanos, de suero y plasma sólo se observó un enlace no específico mínimo en los péptidos acordes a la invención, es decir, sólo se obtuvieron pocos resultados positivos falsos.

En la tabla 3 están representados otros resultados obtenidos por la evaluación de muestras humanas con ELISA (acorde a los ejemplos 1, 2 y 4), basados en la utilización de secuencias menores (15 aminoácidos) de la fórmula (I). Resulta claro que los péptidos para la definición de epítomos de anticuerpos de VHC o como mezcla de múltiples péptidos, que, preferentemente, contienen 3 a 6 péptidos, son adecuados para la determinación de anti-VHC.

ES 2 255 068 T5

TABLA 3

Reactividades de muestras humanas anti VCH positivas en ELISA con péptidos menores que comprenden 15 aminoácidos en la superficie de placas de microtitulación según el ejemplo 1; los resultados se indican como valores de extinción a 450 nm (E_{450}) (- = resultado negativo inferior a 0,10 E)

5

1	4056	4055	4053	4052	4081	4091	mezcla
Nº de muestra							
10							4056
							4055
							4053
15							4052
							4081
							4091
20	$\mu\text{g/ml}$	2	2	2	2	2	Cada 0,5
	BC90-89	>2,50	0,20	-	-	-	1,40
	252	-	-	0,20	-	>2,50	2,10
	90	0,80	-	-	-	1,60	2,00
25	4056	4055	4053	4052	4081	4091	mezcla
	268	>2,50	-	0,20	-	>2,50	>2,50
	84	-	1,20	1,60	-	1,70	>2,50
30	225	>2,50	>2,50	-	-	>2,50	>2,50
	270	2,00	1,70	-	-	2,20	>2,50
	229	0,20	-	-	1,10	1,00	1,50
35	288	>2,50	>2,50	-	0,50	>2,50	>2,50
	290	>2,50	>2,50	-	0,20	>2,50	>2,50
	242	-	0,50	-	-	1,20	1,40
	137	-	-	-	-	0,40	0,35
40	286	-	-	0,60	0,15	0,45	0,15
	192	0,20	>2,50	-	1,00	-	-
	235	0,15	-	0,40	-	0,20	-
45	85	-	-	-	0,75	-	-

45

Se indican las reactividades como se obtienen con una mezcla de péptidos acordes a la invención. Es llamativo que por una formación de señal muy intensa del ELISA utilizando péptidos se obtiene una discriminación fiable entre resultados positivos y negativos. Resultados análogos también se obtuvieron con los siguientes péptidos o mezclas de péptidos acordes a la invención.

50

4074/4081 (cada 2 $\mu\text{g/ml}$)

55

4074/4082 (0,5 y 0,125 $\mu\text{g/ml}$)

4060/4071/4081 (cada 2 $\mu\text{g/ml}$), asimismo, demostraron ser especialmente adecuadas las mezclas de péptidos menores, que comprenden, aproximadamente, 15 aminoácidos:

60

4056/4055 y 4052 (cada 0,5 $\mu\text{g/ml}$).

No se pudo demostrar, en la evaluación con todos los péptidos acordes a la invención, una relación de dependencia de la reactividad de las muestras con su origen geográfico.

65

ES 2 255 068 T5

Ejemplo 5

Optimización de la determinación ELISA

5 Como parámetro variable de la determinación ELISA se varió principalmente la concentración de péptidos utilizada en el revestimiento o en las mezclas de péptidos, su concentración total, así como la relación entre sí, con una concentración constante de conjugado de 1:3000 y dilución de 1:26. Adicionalmente, en las concentraciones de revestimientos determinadas se varió la concentración de conjugado. Ambas magnitudes variables fueron validadas en cuanto a la especificidad, mediante evaluación de sueros y plasmas de donantes de sangre, así como en relación con la sensibilidad, por determinación de anti-VHC en colectivos positivos. Por otro lado, la sensibilidad límite se determinó en forma de sensibilidad analítica a través de dilución serial de muestras anti-VHC positivas (1:2, 1:4 etc. en sueros anti VHC negativos) y comparado con los datos de una prueba comercial, del mismo modo que los resultados obtenidos utilizando los péptidos descritos en la literatura.

15 Los resultados obtenidos con muestras humanas están resumidas a modo de ejemplo en la tabla 4.

TABLA 4

Titulación comparativa de sueros y plasmas anti-VHC positivos en el ELISA utilizando péptidos (4083) y una prueba adquirible comercialmente. Se indican las relaciones como cocientes de las señales específicas respecto del valor límite, asimismo, los valores mayores que 1 presentan un resultado positivo y los valores menores que 1, un resultado negativo

Suero	Dilución en suero negat.		ELISA con péptidos (4083) 2µg/ml 4083 Valor límite 0,10 E	Prueba comercial (HP1) Valor límite 0,454 E
HC 90-84	1:	1	>25	>6
	1:	2	>25	>6
	1:	4	>25	>6
	1:	8	>25	>6
	1:	16	24	>6
	1:	32	10,7	4,1
	1:	64	6,1	2,0
	1:	128	2,5	0,8neg.
	1:	256	1,5	0,5
	1:	512	1,1	0,5
	1:	1024	0,6neg.	0,2
HC 90-90	1:	1	>25	>6
	1:	2	>25	>6
	1:	4	>25	>6
	1:	8	>25	>6
	1:	16	>25	>6
	1:	32	11,8	5,4
	1:	64	5,9	3,7
	1:	128	3,3	1,4

ES 2 255 068 T5

	1:	256	1,8	0,9neg.	
	1:	512	1,08	0,4	
5	1:	1024	0,5neg.	0,3	
	1:	2048	0,4	0,2	
<hr/>					
	HC 90-252	1:	1	>25	>6
		1:	2	>25	>6
10		1:	4	>25	4,5
		1:	8	20	3,2
		1:	16	12,2	2,7
15		1:	32	6,5	1,2
		1:	64	4,2	0,8neg.
		1:	128	2,4	0,5
		1:	256	0,97gw1)	
20	<hr/>				
	HC 90-296	1:	1	>25	>6
		1:	2	>25	>6
		1:	4	20	>6
25		1:	8	8,5	5,0
		1:	16	3,7	2,9
		1:	32	2,9	0,7neg.
30		1:	64	1,4	0,5
		1:	128	0,8neg.	0,4
		1:	256	0,3	0,2
<hr/>					
	HC 90-83	1:	1	>25	>6
35		1:	10	20	2,1
		1:	100	6,5	0,4neg.
<hr/>					
	HC 90-240	1:	1	>25	>6
40		1:	10	8	1,5
		1:	100	1,4	0,3neg.
<hr/>					
	HC 90-239	1:	1	>25	>6
45		1:	10	7,8	2,0
		1:	100	1,4	0,1neg.
<hr/>					
	HC 90-89	1:	1	>25	>6
		1:	10	>25	>6
50		1:	100	9	3,5
<hr/>					
	HC 90-137	1:	1	>25	>6
		1:	1	21	4,2
55		1:	100	4	1,4

¹⁾ gw = de valor límite

Los resultados de la tabla 4 dejan en claro que la sensibilidad del ELISA basado en los péptidos acordes a la invención, medida en la sensibilidad límite de titulaciones de suero es, al menos, tan buena como la de la prueba comercial (HP1) evaluada en diluciones de suero idénticas. En muchos casos, incluso muestras diluidas que con las pruebas comerciales (HP1) ya habían reaccionado varias veces como negativas, aún fueron medidas como positivas por el ELISA con péptidos, de modo que, globalmente, se obtuvo un mejor límite de detección de anticuerpos de VHC con los péptidos acordes a la invención. Resultados análogos también se obtuvieron con otras concentraciones de péptidos, secuencias de péptidos o mezclas de los nuevos péptidos, por ejemplo,

4083 (0,25 µg/ml)

ES 2 255 068 T5

4074/4081 (cada 0,25 µg/ml)

4074/4082 (cada 0,5 µg/ml)

5 4074/4082 (0,5 y 0,125 µg/ml)

4060/4082 (cada 2 µg/ml)

10 Más allá de la determinación de la sensibilidad límite, en el caso de los sistemas optimizados también se verificó la especificidad a partir de anticuerpos de VHC no específicos y otros factores potenciales de fallas, de este modo quedó claro que la determinación de anti-VHC con los péptidos acordes a la invención para VHC es específica y no está sometida a las interferencias conocidas, por ejemplo, reacciones cruzadas de otros anticuerpos, fallas por activación de calor o similares. Acorde a la invención esto vale también para otros péptidos nuevos o mezclas de péptidos en las cuales se utilizó de manera uniforme una concentración de suero elevada (dilución 1:2 en tampón de muestras), para 15 incrementar la sensibilidad, lo cual fue posible gracias a la pureza de los péptidos y la elevada densidad de antígenos en la fase sólida.

20 Las comparaciones reunidas en la tabla 5 entre otro péptido del núcleo acorde a la invención, el SP10 y la HP1 también dejan claro que el péptido acorde a la invención presenta ventajas respecto del estado actual de la técnica, que, a su vez, consiste en una sensibilidad límite mejorada, es decir, una sensibilidad analítica incrementada. De esta manera se determinaron las 4 titulaciones de la tabla 5 respecto del péptido publicado con un factor de 2 a 4 veces más sensible y, en comparación con una prueba comercial (HP1), incluso, con un factor de 8 a 32 veces.

TABLA 5

25 *Comparación de la sensibilidad analítica de un ELISA basado en un péptido del núcleo (Sp10, 2 µg/ml) con el estado actual de la técnica. Para ello se obtuvieron series de dilución de sueros humanos anti-VHC positivos en suero humano negativo y los resultados de la evaluación con un ELISA basado en un péptido (SP10) en comparación con 30 el ELISA VHC comercial (HP1) así como un péptido que, acorde a la imagen 2, es descrito en la literatura como inmunorelevante, (OKAMOTO et al.). Todas las indicaciones son valores de extinción ($E_{450\text{ nm}}$), asimismo, están subrayados los resultados que se deben considerar reactivos*

Suero n°	Péptido SP10		péptido conocido en la literatura (OKAMOTO)		ELISA anti-VHC comercial (HP1)
Dilución	AA 1 - 30	AA 39 - 74	2 µg/ml	0,25 µg/ml	
	2 µg/ml	0,25 µg/ml	2 µg/ml	0,25 µg/ml	
HC 90-85	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500
1:1					
1:32	>2,500	>2,500	1,008	0,878	<u>0,908</u>
1:64	1,586	0,742	0,548	0,477	-
1:128	1,032	0,783	0,250	<u>0,183</u>	-
1:256	0,601	0,519	<u>0,101</u>	0,098	

ES 2 255 068 T5

	1:512	0,328	0,232	0,060	0,051		
	1:1024	<u>0,188</u>	<u>0,122</u>				
	1:2048	0,080	0,034				
5	HC 90-	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500		>2,500
	225 1:1						
	1:16	>2,500	>2,500	>2,500	2,366		>2,500
10	1:32	>2,500	2,065	2,020	1,619		>2,500
	1:64	1,669	1,520	0,655	0,883		1,759
	1:128	0,971	0,790	0,414	0,544		0,909
15	1:256	0,561	0,374	0,281	0,215		0,380
	1:512	0,486	0,191	<u>0,146</u>	<u>0,157</u>		0,122
	1:1024	<u>0,295</u>	<u>0,141</u>	0,080	0,115		
20	HC 90-	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500		>2,500
	270 1:1						
	1:8	>2,500	>2,500	>2,500	2,222		1,902
	1:16	>2,500	2,500	1,478	1,016		0,980
25	1:32	1,512	1,408	0,743	0,478		<u>0,501</u>
	1:64	0,898	0,802	0,322	<u>0,216</u>	-	0,259 -
	1:128	0,536	0,483	<u>0,121</u>	0,096		0,179 -
30	1:256	<u>0,312</u>	<u>0,275</u>	0,050	0,041		
	HC 90-	>2,500	>2,500	>2,506	>2,500		>2,500
	354 1:1						
	1:32	>2,500	>2,500	1,917	0,786		<u>0,496</u> +/-
35	1:64	>2,500	1,833	1,282	0,527		0,352 -
	1:128	1,703	0,873	0,685	<u>0,249</u>		0,200 -
	1:256	0,918	0,410	0,367	0,082		
40	1:512	0,582	0,310	<u>0,145</u>			
	1:1024	0,326	<u>0,178</u>	0,072			
	1:2048	<u>0,159</u>	0,084				

45

Con la evaluación de otro péptido del núcleo acorde a la invención (SP 23) se obtuvieron resultados similares. Los resultados comparativos presentados en la tabla 6 permiten observar que el SP 23 corresponde al SP 10 en cuanto a la sensibilidad, asimismo, ambos péptidos sobresalen ventajosamente sobre los péptidos descritos en la literatura.

50

A pesar de que el péptido análogo al de la literatura SP 12 (AS 47-75) no corresponde exactamente al péptido descrito por OKAMOTO *et al.* (AS 39-74), gracias a los resultados de la secuencia intermedia (SP 11, As 24-53, tabla 6) se puede observar que en la siguiente área de la secuencia (AS 39-47) no se encuentran epítomos inmunorelevantes y la reactividad muy débil, aún por detectar, del SP 11 se debe al área carboxiterminal contenida en el SP 10 (área superpuesta AS 24-30 acorde a la figura 3).

55

60

65

ES 2 255 068 T5

TABLA 6

Comparación de las reactividades inmunes en el ELISA entre 2 péptidos y una secuencia de aminoácidos que se encuentra entre la secuencia publicada (AS 39-74), OKAMOTO et al.) y las nuevas estructuras (SP 11, AS 24-53, véase también figura 3). Todas las indicaciones representan valores de extinción ($E_{450\text{ nm}}$)

		SP23	SP10	SP11
Muestras		AS8-26	AS1-30	AS24-53
		2µ/ml	2µ/ml	2µg/ml
pos.contr.		>2.500	>2.500	0.405
neg.contr.		>0,051	>0,049	0,030
Diluciones				
HC-90-225				
1:	16	2.203	>2.500	0.428
1:	64	1.329	1.367	0.164
1:	256	0.454	0.386	0.024
1:	1024	0.195	0.142	
HC-90-354				
1:	16	>2.500	>2.500	0.164
1:	64	1.413	2.156	0.059
HC-90-354				
1:	256	0.418	0.496	
1:	1024	<u>0.124</u>	<u>0.162</u>	
Muestras anti-VHC positivas (prueba comercial HP1)				
HC90-371		<u>2.200</u>	<u>2.086</u>	<u>0.224</u>
HC90-336		<u>>2.500</u>	<u>>2.500</u>	<u>0.335</u>
HC90-453		<u>>2.500</u>	<u>>2.500</u>	0,058
HC90-570		<u>1.877</u>	<u>2.277</u>	0,088

Queda en claro, sobre todo, esta sorprendente ventaja de sensibilidad en la evaluación de muestras no diluídas. De ese modo, las 11 muestras de la tabla 11, anti-VHC positivas, son todas determinadas como reactivas con el péptido acorde a la invención, mientras que el péptido descrito en la literatura sólo halla positivas a 6 muestras y en la prueba comercial (HP1) en ningún caso la reacción es positiva. En relación con las muestras que coincidentemente reaccionan positivamente con ambos péptidos, es llamativo que el péptido acorde a la invención reaccione con una intensidad significativamente más intensa en las mismas condiciones de prueba, lo cual presenta importantes ventajas, especialmente, para la discriminación positivo/negativo.

ES 2 255 068 T5

TABLA 7

Comparación de la sensibilidad de un ELISA con péptidos (SP10 2 µg/ml) y el estado actual de la técnica. Para ello se evaluaron 11 muestras de suero humano nativo anti-VHC positivas con un ELISA basado en un péptido, en comparación con la prueba comercial (HP1) así como un péptido descrito en la literatura como inmunorelevante, acorde a la figura 3 (OKAMOTO *et al.*). Todas las indicaciones representan valores de extinción ($E_{450\text{ nm}}$). Las muestra anti-VHC positiva HC 90-495 fue evaluada como control

Suero nº	Péptido	Péptido descrito en la literatura (OKAMOTO)	ELISA VHC comercial (HP1) corte 0,454 E	
	SP10 2 µg/ml corte: 0,100 E	SP12 2 µg/ml corte: 0,100 E		
HC 90-224	1,952	2,005	0,114	Neg.
HC 90-284	2,417	0,451	0,095	Neg.
HC 90-289	>2,500	1,220	0,278	Neg.
HC 90-300	>2,500	0,288	g.w.	0,208
HC 90-323	>2,500	>2,500	0,313	Neg.
HC 90-493	>2,500	0,051	Neg.	0,088
HC 90-509	>2,500	0,081	Neg.	0,083
HC 90-512	>2,500	0,049	Neg.	0,110
HC 90-531	2,208	0,257	g.w.	0,081
HC 90-536	2,500	0,234	g.w.	0,069
HC 90-494	1,279	n.d.	0,114	Neg.
HC 90-495	>2,500	>2,500	>2,500	Pos.

Estos hallazgos (tabla 7) derivados de las titulaciones (tabla 5) y de sueros humanos nativos preseleccionados con los péptidos del núcleo son confirmados por los resultados de la evaluación del panel de suero adquirible comercialmente (LOT # PHV 101 y LOT # PHV 201, Boston Biomedica, EEUU).

Los resultados del denominado low titre Anti VHC-Panel (Panel anti-VHC de baja titulación) están reunidos individualmente en la tabla 8, y los resultados del Mixed titre Anti HCV-Panel (Panel anti-VHC de titulación mixta), en la tabla 9. Los resultados de los datos obtenidos con el péptido del núcleo acorde a la invención fueron contrastados con los datos obtenidos con las pruebas comerciales acordes al estado actual de la técnica.

ES 2 255 068 T5

TABLA 8

La tabla 8 muestra la comparación de la sensibilidad de un ELISA con péptidos (SP 10, 2 µg/ml) respecto del estado actual de la técnica, en el caso de muestras nativas anti-VHC positivas del panel PHV 101, que comprende 15 muestras anti VHC positivas de baja titulación, bien caracterizadas (Comercialización del material y de los resultados comparativos de las pruebas, Boston Biomedica, EEUU). Todas las indicaciones ELISA se llevan a cabo como valores de relación, con lo cual se describe la proporción de extinción de muestras y cut-off. Valores de < 1,0 se consideran negativos y > 1,0, positivos

Número ID miembro	Resultados comparativos		Resultado	ELISA con péptidos acorde a la invención (BP10/2µg/ml) B/CO
	EIA VHC B/CO	ELISA VHS B/CO		
PHV101-01	3.717	0.964	POS	18 +
PHV101-02	0.167	0.268	N	0,25 -
PHV101-03	1.880	1.323	POS	0,90 -
PHV101-04	1.757	3.076	POS	> 25
PHV101-05	3.404	2.169	POS	4,0
PHV101-06	1.640	1.642	POS	> 25
PHV101-07	2.281	1.624	POS	> 25
PHV101-08	3.009	1.588	POS	> 25
PHV101-09	1.855	1.119	POS	> 25
PHV101-10	3.649	3.098	POS	> 25
PHV101-11	0.662	1.820	POS	> 25
PHV101-12	3.018	2.205	POS	> 25
PHV101-13	2.805	2.770	POS	> 25
PHV101-14	1.912	0.846	POS	> 25
PHV101-15	3.686	3.240	POS	> 25

TABLA 8 (Cont.)

Número ID miembro	Datos confirmatorios				RESULT*	ALT**	anti-IL6c*	HbsAg*	anti-HIV*	anti-HIV*	ELISA con péptidos acorde a la invención (Sp 10/ 2µg/ml) S/Co
	5-1-1	C-100-J	C3JC	C22-C							
PHV101-01	1	+/-	+/-	2	POS	L	N	N	N	N	18 +
PHV101-02	-	-	-	-	N	L	N	N	N	N	0,25 -
PHV101-03	+/-	+/-	+/-	-	N	L	N	N	N	N	0,90 ~
PHV101-04	+/-	+/-	4	4	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PHV101-05	-	+/-	-	+/-	N	L	N	N	N	N	4,0
PHV201-06	+/-	-	1	4	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PHV101-07	-	+/-	1	4	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PHV101-08	+/-	-	1	4	POS	G	POS	N	N	N	> 25
PHV101-09	-	-	1	4	POS	L	N	N	N	N	> 25
PHV101-10	1	-	2	4	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PHV101-11	1	+/-	1	1	POS	L	N	N	N	N	> 25
PHV101-12	2	-	4	4	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PHV101-13	+/-	+/-	4	3	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PHV101-14	+/-	-	1	3	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PHV101-15	1	-	3	4	POS	L	POS	N	N	N	> 25

* POS = positivo, N = negativo, NA = no aplicable

L = menor que 2 veces el límite superior de normal, G = mayor que 2 veces el límite superior de normal.

Los resultados de ALT son los que se leen después de la filtración en condiciones estériles y de la toma de viales y puede no reflejar el estado de ALT del donante en el momento de la donación.

ES 2 255 068 T5

5 Por los datos de la tabla 8 se puede ver que con una sola excepción (PHV 01-03) todas las muestras anti-VHC positivas presentan una reacción positiva correcta con el nuevo péptido. En comparación con las pruebas comerciales es llamativo que la intensidad de la señal, expresada en una señal de relación de prueba: corte con el péptido acorde a la invención se determinó significativamente más intenso que con los ensayos comparativos evaluados, con lo cual se manifiesta una fiabilidad notablemente mayor del nuevo ELISA basado en péptidos.

10 Acorde a estos datos (relación > 25, lo cual corresponde a extinciones de > 2,5), se trata sólo según la definición acorde al estado actual de la técnica, muestras de baja titulación, que con el nuevo péptido son determinadas con una reacción sorprendentemente intensa.

15 La única excepción (muestra 03) tiene su explicación en los datos del resultado comparativo de la prueba de confirmación, que detecta una falta de anticuerpos específicos del núcleo en dicha muestra (C22c representa la proteína del núcleo obtenida por tecnología genética en *E. coli*). Acorde a dicha prueba, la muestra 03 incluso debería clasificarse como negativa.

20 La evaluación del segundo panel resumida en la tabla 9 muestran observaciones similares: De un total de 22 muestras anti-VHC positivas, sorprendentemente, 19, con extinciones mayores que 2,5 (corresponde a una relación > 25) son halladas con una reacción positiva extremadamente intensa. Los tres sueros anti-VHC negativos del panel se clasifican correctamente como negativos (relaciones < 1,0). Finalmente, también las muestras n° PHV 201-08, -10 y -20 se consideran correctas según el planteo del problema, dado que dichas muestras no presentan anticuerpos específicos del núcleo (-08 y -10) o pocos de ellos (-20) acorde a la prueba de verificación.

25

(Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 255 068 T5

TABLA 9

La tabla 9 muestra la comparación de la sensibilidad de un ELISA con péptidos (SP 10, 2 µg/ml) respecto del estado actual de la técnica, en el caso de muestras nativas anti-VHC positivas del panel PHV 201, que comprende muestras anti-VHC positivas bien caracterizadas con diferentes títulos anti-VHC. (Comercialización del material y de los resultados comparativos de las pruebas, Boston Biomedical, EEUU). Todas las indicaciones de ELISA se efectúan a modo de relaciones que representan los cocientes como extinción de muestras y valor de corte. Valores de < 1,0 se consideran un resultado negativo y > 1,0, un resultado positivo

Número ID miembro	Resultados comparativos		Resultado	ELISA con péptidos acorde a la invención (SP 10/ 2 µg/ml) S/Co
	EIA VHC	ELISA VHS		
PHV201-01	1.689	1.475	POS	> 25
PHV201-02	3.660	5.660	POS	> 25
PHV201-03	3.793	3.946	POS	> 25
PHV201-04	0.271	0.176	N	0,10 -
PHV201-05	3.417	2.591	POS	> 25
PHV201-06	3.711	4.005	POS	> 25
PHV201-07	0.260	0.108	N	0,25 -
PHV201-08	1.515	1.244	POS	0,75 -
PHV201-09	2.530	1.274	POS	> 25
PHV201-10	2.174	2.745	POS	> 25
PHV201-11	2.003	2.169	POS	> 25
PHV201-12	3.641	4.769	POS	> 25
PHV201-13	4.115	5.662	POS	> 25
PHV201-14	2.669	4.300	POS	> 25
PHV201-15	4.115	5.660	POS	> 25
PHV201-16	4.115	5.662	POS	> 25
PHV201-17	4.115	5.662	POS	> 25
PHV201-18	3.530	3.943	POS	> 25
PHV201-19	0.490	1.520	N	0,25 -
PHV201-20	2.611	2.377	POS	> 25
PHV201-21	3.430	2.666	POS	> 25
PHV201-22	1.721	1.690	POS	> 25
PHV201-23	4.115	5.662	POS	> 25
PHV201-24	2.500	2.631	POS	> 25
PHV201-25	4.115	5.660	POS	> 25

ELISA con péptidos
acorde a la invención

(SPI0 / 2 µg/ml)

S/Co

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

anti-HIV^a

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Número ID miembro	Datos confirmatorios										ELISA con péptidos acorde a la invención (SPI0 / 2 µg/ml) S/Co
	5-1-1	C-100-3	C13C	C22-C	RESULT ^a	ALT ^a	anti-HIV ^a	anti-HIV ^a	anti-HIV ^a	anti-HIV ^a	
PIV201-01	+/-	-	2	4	POS	L	N	N	N	N	> 25
PIV201-02	1	2	4	4	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PIV201-03	-	1	-	4	POS	L	N	N	N	N	> 25
PIV201-04	-	-	-	-	N	L	N	N	N	N	0,10 -
PIV201-05	2	+/-	+/-	4	POS	L	N	N	N	N	> 25
PIV201-06	2	1	4	4	POS	L	N	N	N	N	> 25
PIV201-07	-	-	-	-	N	L	N	N	N	N	0,25 -
PIV201-08	-	+/-	3	-	I	L	POS	N	N	N	0,75 -
PIV201-09	1	-	4	4	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PIV201-10	+/-	+/-	2	-	I	L	N	N	N	N	0,25 -
PIV201-11	2	+/-	3	3	POS	G	N	N	N	N	> 25
PIV201-12	2	2	2	3	POS	L	N	N	N	N	> 25
PIV201-13	4	4	4	4	POS	L	N	N	N	N	> 25
PIV201-14	2	+/-	4	4	POS	L	POS	N	POS	N	> 25
PIV201-15	2	+/-	4	4	POS	L	N	N	N	N	> 25
PIV201-16	4	4	4	4	POS	L	N	N	N	N	> 25
PIV201-17	4	4	4	4	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PIV201-18	+/-	2	4	3	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PIV201-19	-	+/-	-	-	N	L	N	N	N	N	0,25 -
PIV201-20	1	1	1	+/-	POS	L	N	N	N	N	> 25
PIV201-21	1	+/-	3	4	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PIV201-22	+/-	-	4	4	POS	L	N	N	N	N	> 25
PIV201-23	4	3	4	4	POS	L	POS	N	N	N	> 25
PIV201-24	2	4	4	4	POS	G	POS	POS	N	N	> 25
PIV201-25	4	1	4	4	POS	L	N	N	N	N	> 25

* POS = positivo, N = negativo, NA = no aplicable

L = menor que 2 veces el límite superior de normal, G = mayor que 2 veces el límite superior de normal.

Los resultados de ALT son los que se leen después de la filtración en condiciones estériles y de la toma de viales y puede no reflejar el estado de ALT del donante en el momento de la donación.

ES 2 255 068 T5

Ejemplo 6

Determinación de anti-VHC en sueros de chimpancés con péptidos en el ELISA

5 Se analizaron diferentes péptidos o mezclas de péptidos en las cavidades de placas de microtitulación con sueros de chimpancés infectados con diferentes dosis infecciosas de VNANB. De las extracciones secuenciales cada 2 semanas posteriores a la inoculación se midieron, además, de GOT, también GPT, con pruebas comerciales, y todas las muestras se determinaron paralelamente, así como en el ELISA con péptidos. De manera similar al caso de las pruebas comerciales (HP1) del en el caso del ejemplo 3, en el caso de del ELISA con péptidos los anticuerpos policlonales de conejo, marcados con POD, se utilizaron con una concentración 4 veces mayor, asimismo, se utilizó el sustrato de enzima TMB, con medición fotoeléctrica, a 450 nm. La realización de la prueba correspondía a la determinación descrita anteriormente de anti-VHC humano con 0,1 E como determinación de valor límite así como la representación de los resultados de la tabla 10 como relación de los valores específicos de extinción para este valor de corte (relaciones).

15 Los resultados presentados en las tablas 10A a 10C y 11A a 11B con péptidos del área de NSP 4 representan las denominadas "relaciones", con las cuales es definido el cociente de señal específica y valor límite.

20 TABLAS 10 A-C

Determinación de a VHC en muestras de chimpancés con una prueba comercial (HP1) y ELISA con péptidos o mezclas de péptidos del área NSP 4. Las indicaciones se efectúan en los primeros 3 valores temporales en extinciones que sirven para la determinación de los valores límite, a partir de lo cual se formaron las siguientes relaciones de señal específica y valor límite

25

TABLA 10 A

30

Animal número 123*					
	ALT	Prueba comerc. (HP1)	4083	4083	4060
Tiempo(semanas)			2µg/ml	0,5µ/ml	4081 cada2µg/ml
0=inoculación	25	0,500 E ₄₉₂	0,032 E ₄₅₀	0,041 E ₄₅₀	0,026 E ₄₅₀
2	23	0,600 E	0,027 E	0,024 E	0,014 E
4	23	0,450 E	0,013 E	0,025 E	0,019 E
Valores de extinción (E) definen los <u>valores límite:</u>		0,7 E	0,10 E	0,10 E	0,10 E
Relaciones(r):					
6	29	r 0,6	r 0,01	r 0,03	r 0,03
8	30	r 0,4	r 0,02	r 0,03	r 0,03
10	50	r 0,7	r 0,01	r 0,02	r 0,02
12	55	r 0,4	r 0,02	r 0,03	r 0,03
14	50	r 0,5	r 0,01	r 0,03	r 0,03
16	140	r 0,6	r 0,03	r 0,03	r 0,03
18	>170	r 0,7	r 5,3 pos.	r 1,5 pos.	r 0,6
20	30	r 0,6	r 7,4 pos.	r 1,8 pos.	r 0,7

65

ES 2 255 068 T5

22		23	r 0,5	r 5,7 pos.	r 1,1	r 0,5
					pos.	
24		23	r 0,6	r 2,7 pos.	r 0,7	r 0,3
26		30	r 0,6	r 1,5 pos.	r 0,4	r 0,3

*) infección con NANB confirmada mediante análisis microscópico de electrones de biopsia de hígado

TABLA 10 B

Animal número 048							
	ALT	Prueba comercial (HP1)	4083	4083	4060 4081	4073	4090
Tiempo (semanas)			2 µg/ml	0,5 µ/ml	cada 2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml
0=inoculación	20	0,5 E ₄₉₂	0,018	0,027	0,008	0,036	0,028
			E ₄₅₀	E ₄₅₀	E ₄₅₀	E ₄₅₀	E ₄₅₀
2	25	0,5 E	0,041 E	0,070 E	0,007 E	0,041 E	0,050 E
4	23	0,5 E	0,026 E	0,050 E	0,009 E	0,039 E	0,037 E
Valores de extinción (E) definen los valores límite:	0,70 E	0,10 E	0,10 E	0,10 E	0,10 E	0,10 E	
Relaciones(r):							
10	32	r 0,6	r 0,3	r 0,5	r 0,2	r 0,6	r 0,6
12	100	r 0,4	r 1,0 gw ¹⁾	r 0,1 gw ¹⁾	r 0,95 gw ¹⁾	r 2,0 pos.	
14	112	r 0,7	r 11,7 pos.	r 4,9 pos.	r 0,1	r 6,9 pos.	r 16,2 pos.
16	30	r 1,0	r 7,4 pos.	r 3,8 pos.	r 0,2	r 12,2 pos.	r 23,2 pos.
18	25	r 0,7	r 7,2 pos.	r 2,8 pos.	r 0,2	r 7,8 pos.	r 18,9 pos.
20	30	r 0,8	r 8,6 pos.	r 4,7 pos.	r 0,1	r 12,8 pos.	r 16,4 pos.
22	25	r 0,8	r 8,4 pos.	r 5,4 pos.	r 0,1	r 11,7 pos.	r 22,3 pos.
24	23	r 0,8	r 9,8 pos.	r 7,2 pos.	r 0,2	r 15,5 pos.	r 20,0 pos.
26	20	r 0,8	r 10,8 pos.	r 6,0 pos.	r 0,2	r 13,0 pos.	r 17,4 pos.
28	20	r 0,8	r 9,8 pos.	r 5,4 pos.	r 0,2	r 11,7 pos.	r 8,9 pos.

ES 2 255 068 T5

30	20	r 1,0 gw1)	r 7,6 pos.	r 6,3 pos,	r 0,2	r 11,5	r 12,9
						pos.	pos.
5	32	r 1,3 pos.	r 16,2	r 17,4	r 1,3 pos.	r 24,5	r 23,3
			pos.	pos,		pos.	pos.
	34	r 2,0 pos.	r 18,4	r 22,5	r 2,0 pos.	r >25	r >25
			pos.	pos,		pos.	pos.
10	36	r 2,4 pos.	r 16,1	r 22,0	r 2,0 pos,	r >25	r >25
			pos.	pos,		pos.	pos.
	38	r 2,1 pos.	r 17,9	r >25	r 2,1 pos.	r >25	r >25
			pos.	pos,		pos.	pos.
15	40	r 2,9 pos,	r >25	r >25	r 2,5 pos.	r >25	r >25
			pos.	pos,		pos.	pos.

¹⁾ gw = de valor límite positivo

TABLA 10 C

Animal número 147							
	ALT	Prueba comerc. (HP1)	4083	4083	4060 4081	4074 4081	
Tiempo (semanas)			2 µg/ml	0,5 µ/ml	cada µg/ml	2 µg/ml	2
0	= 30	0,60 E492	0,068 E ₄₅₀	0,042 E ₄₅₀	0,008 E ₄₅₀	0,027 E ₄₅₀	
inoculación							
2	25	0,50 E	0,043 E	0,029 E	0,012 E	0,032 E	
4	30	0,45 E	0,066 E	0,033 E	0,015 E	0,023 E	
Valores de extinción		0,70 E	0,10 E	0,10 E	0,10 E	0,10 E	
(E) definen los valores límite							
Relaciones (r):							
16	52	r 0,5	r 0,2	r 0,2	r 0,1	r 0,3	
18	75	r 0,5	r 1,1 pos.	r 0,3	r 0,1	r 0,2	
20	110	r 0,8	r 6,5 pos.	r 1,6 pos.	r 0,2	r 0,3	
22	40	r 0,6	r 11,8 pos.	r 5,9 pos.	r 0,2	r 0,5	
24	75	r 0,6	r 7,6 pos.	r 3,7 pos.	r 0,1	r 1,0 gw ¹⁾	
26	70	r 0,4	r 12,5 pos.	r 6,0 pos.	r 0,1	r 2,2 pos.	
28	55	r 0,5	r 10,9 pos.	r 4,9 pos.	r 0,2	r 2,1 pos.	
30	52	r 0,6	r 8,9 pos.	r 6,2 pos.	r 0,4	r 3,5 pos.	
32	42	r 0,7	r 11,3 pos.	r 6,9 pos.	r 0,9	r 3,4 pos.	
34	48	r 0,8	r 13,3 pos.	r 14,1 pos.	r 1,6 pos,	r 7,6 pos.	
36	48	r 0,8	r 19,9 pos.	r 19,7 pos.	r 2,8 pos.	r 9,5 pos.	
38	35	r 1,3 pos.	r 20,8 pos.	r 24,7 pos.	r 2,5 pos.	r 11,0 pos.	
40	45	r 1,3 pos.	r >25 pos.	r >25 pos.	r 3,4 pos.	r 15,0 pos.	

1) gw = de valor límite positivo

ES 2 255 068 T5

Los resultados representados en las tablas 10 A-C subrayan la ventaja de los péptidos, especialmente, si se los compara con los resultados correspondientes de la prueba comercial (HP1) y el desarrollo ALT.

5 Por ejemplo, mediante la prueba comercial (HP1) el animal nº 123 no es hallado positivo en anticuerpos, a pesar de que a partir de las biopsias de hígado se detectó por microscopio electrónico una HNANB. A diferencia de ello, con el ELISA basado en 4083 fue posible, casi simultáneamente con el incremento de ALT, una detección fiable de anticuerpos de VHC.

10 Especialmente la congruencia temporal de los resultados del ELISA con péptidos y los valores ALT incrementados, queda claro en el animal número 048, en el cual se efectuó una detección muy fiable de un anti-VHC, con casi todos los péptidos descritos o mezclas de péptidos, al mismo tiempo que aumentaba el ALT y, en promedio, 18 semanas antes de la prueba comercial (HP1), con una marcada discriminación positivo-negativo. Especialmente la comparación entre los péptidos demuestran que el reconocimiento de los anticuerpos de VHC tempranos por el péptido total de la fórmula I (4083) son determinados conjuntamente, de manera notable, por la secuencia de aminoácidos media, como lo demuestra la comparación de la mezcla de 4060 y 4081 (secuencias aminoterminales y carboxiterminales) y el 4090 que comprende la estructura media.

20 Se obtuvieron resultados similares de una detección temprana, casi simultánea con ALT, de anticuerpos de VHC en las investigaciones del animal nº 147, en la cual es posible una detección fiable de anticuerpos de VHC aproximadamente al mismo tiempo que el incremento de ALT, nuevamente, aproximadamente 16 -18 semanas antes de la prueba comercial (HP1).

TABLAS 11 A y B

25 *Determinación de anti-VHC en muestras de suero de 2 chimpancés infectados con VHC. Se presentan los resultados obtenidos con la prueba comercial (HP1) en comparación con un péptido del núcleo obtenido sintéticamente (SP 10, 2 µg/ml), asimismo, los resultados se representan como relaciones de la señal específica y el valor límite*

Animal número 048			
Tiempo(semanas)	ALT	ELISA VHC comercial (HP1)	SP 10 ELISA 2 µg/ml
0=inoculación	20	0,5 E ₄₉₂	0,09 E ₄₅₀
2	25	0,5 E	0,21 E
4	23	0,5 E	0,13 E
Valores de extinción (E) definen los valores límite		0,70 E	0,10 E
8 relaciones (r)	34	r 0,4	0,50
10	32	r 0,6	r >20,0 pos.
12	100	r 0,4	r >20,0 pos.
14	112	r 0,7	r >20,0 pos.
16	30	r 1,0	r >20,0 pos.
18	25	r 0,7	r >20,0 pos.
20	30	r 0,8	r >20,0 pos.
Animal número 048			
Tiempo(semanas)	ALT	ELISA VHC comercial (HP1)	SP ELISA 2µg/ml
22	25	r 0,8	r 19,0pos.
24	23	r 0,8	r 20,0pos.

ES 2 255 068 T5

	26	20	r 0,8	r 18,5pos.
	28	20	r 0,8	r 10,4pos.
	30	20	r 1,0	gw1)
5	32	25	r 1,3pos.	r 17,6pos.
	34	25	r 2,0pos.	r 15,4pos.
	36	28	r 2,4pos.	r >20,0pos.
10	38	28	r 2,1pos.	r >20,0pos.
	40	26	r 2,9pos.	r >20,0pos.
<hr/>				
Animal número 147				
	Tiempo (semanas)	ALT	ELISA VHC comercial (HP1)	SP 10- ELISA 2µg/ml
15	0 = inoculación	30	0,60 E ₄₉₂	0,011 E ₄₅₀
	2	25	0,50 E	0,032
20	4	30	0,45 E	0,029
	Valores de extinción (E) definen los valores límite		0,70 E	0,10 E
<hr/>				
	16 relaciones(r)	52	r 0,5	r 0,2
25	18	75	r 0,5	r 0,1
	20	110	r 0,8	r 0,2
	22	40	r 0,6	r 0,4
	24	75	r 0,6	r 0,3
30	26	70	r 0,4	r 0,2
	28	55	r 0,5	r 0,3
	30	52	r 0,6	r 0,2
35	32	42	r 0,7	r 0,4
	34	48	r 0,8	r >20,0pos.
	36	48	r 0,8	No evaluado
	38	35	r 1,3pos.	No evaluado
40	40	45	r 1,3pos.	r >20,0pos.

1) gw = de valor límite positivo

También los resultados representados en las tablas 11 A y B con un nuevo péptido subrayan la ventaja de los péptidos, especialmente, si se los compara con los resultados correspondientes del ELISA comercial (HP1) y el desarrollo de ALT.

Especialmente la congruencia temporal de los resultados del ELISA con péptidos del núcleo y los valores ALT incrementados, queda claro en el animal número 048, en el cual se efectuó una detección muy fiable de un anti-VHC al mismo tiempo que aumentaba el ALT y, en promedio, 20 semanas antes del ELISA comercial (HP1), con una marcada discriminación positivo-negativo.

Se obtuvieron resultados similares de una detección temprana, casi simultánea con ALT, de anticuerpos de VHC en las investigaciones del animal n° 147, en la cual es posible una detección fiable de anticuerpos de VHC, nuevamente, aproximadamente 4 semanas antes de la prueba comercial (HP1).

En su totalidad, los péptidos acordes a la invención o su utilización en el procedimiento inmunoquímico de detección son esencialmente más sensibles que todos los procedimientos descritos hasta ahora basados en proteínas obtenidas por tecnología genética así como otros péptidos sintéticos del estado actual de la técnica. en el caso de una sensibilidad mejorada en fases infecciosas posteriores, los nuevos péptidos brindan, adicionalmente, ventajas fundamentales, haciendo posible la determinación fiable de anticuerpos de VHC y reduciendo con ello notablemente el periodo de ventana existente hasta hoy. Por otro lado, los péptidos demostraron ser considerablemente menos sensibles a enlaces no específicos, lo cual se manifiesta, no en última instancia, en un background drásticamente reducido respecto de la prueba comercial (HP1) (max. 0,10 E₄₅₀) en comparación con max. 0,4 E₄₉₂ en la prueba comercial (HP1), y esto es posible tanto en muestras de origen animal como así también humano, de modo que se hace posible una discriminación notablemente más precisa entre negativo y positivo. Finalmente, debemos mencionar como aspectos ventajosos la duración total más breve y la determinación más precisa debido al volumen de muestras por pipetear, de 50 µl.

ES 2 255 068 T5

Ejemplo 7

Preparación de soluciones de péptidos para generar una mezcla de péptido 4 4083 y péptido del núcleo SP 10 así como revestimiento de placas de microtitulación con dicha mezcla de péptidos

5 A partir de soluciones originales de los péptidos SP 10 y 4083 en 50% de ácido acético en agua destilada, que contenían 1 a 6 mg de péptido/ml se crean series dobles de dilución en 0,10 M de carbonato de sodio de pH 9,6, es decir, una serie con las concentraciones 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,2; 0,1; 0,05 y 0,01 μg de péptido/ml. en el caso de mezclas de péptidos individuales se procedió de manera análoga, asimismo, las soluciones
10 originales fueron mezcladas adicionalmente en proporciones muy diferentes, por ejemplo, 10:1 o 1:4, para obtener por dilución en 0,1 M de carbonato de sodio las concentraciones finales indicadas anteriormente, que, sin embargo, en el caso de mezclas de múltiples péptidos los contienen en la misma concentración (en el caso de mezclas de 1:1) o en diferentes proporciones entre sí.

15 100 μl de cada una de las diluciones se dispusieron en, respectivamente, 16 cavidades de placas de microtitulación, tipo B de Nunc, Roskilde, Dinamarca. Las placas de prueba llenadas con las diluciones se mantuvieron durante 18 horas a 20°C, luego las soluciones fueron extraídas por aspiración de las cavidades y éstas fueron lavadas 3-4 veces con 300 μl de una solución de 10 g/l de albúmina de suero vacuno en solución fisiológica de sal común amortiguada con fosfato, (PBS, pH 7,4) mediante llenado y aspirado y las placas de prueba fueron secadas posteriormente con gel
20 de sílice a 20°C.

Ha demostrado ser adecuada para el revestimiento de la mezcla de péptidos una concentración de 1 μg de 40 83/ml y 1 μg de SP 10/ml, asimismo, dicha concentración representa la base de los resultados reunido en las tablas 12 a 14, obtenidos como se describe en los ejemplos 4 y 5. A diferencia de las comparaciones realizadas hasta ahora con el
25 estado actual de la técnica, todas las siguientes comparaciones tendrán como objeto un ELISA anti-VHC de segunda generación (HP 2) como se describe en el ejemplo 3.

Tablas 12 y 13

30 Las indicaciones respecto del ELISA HP 2 acorde a la invención y comercial representan los denominados títulos de punto final, con los cuales se define la mayor dilución previa de un suero en un suero anti-VHC negativo detectada en una prueba determinada de manera reproducible y positiva.

35

TABLA 12

BBI Low titre Anti HCV PANEL PHV 101 (Panel anti-VHC de baja titulación BBI VPH 101)

Número miembro	ID	ELISA acorde a la invención SP 4083/ SP 10 cada 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Prueba comercial anti-VHC (HP2)
PHV101-01		1:16	1:2
PHV101-02		negativo	negativo
PHV101-03		1:4	1:1
PHV101-04		1	:
		512	1:64
PHV101-05		1:2	1:1
PHV101-06		1:128	1:32
PHV101-07		1:128	1:128
PHV101-08		1:64	1:16
PHV101-09		1:64	1:16
PHV101-10		1:256	1:128
PHV101-11		1:32	1:16
PHV101-12		1:512	1:128
PHV101-13		1:16	1:64
PHV101-14		1:64	1:32
PHV101-15		1:128	1:64

ES 2 255 068 T5

TABLA 13

BBI Mixed titre Anti HCV PANEL PHV 201 (Panel anti-VHC de titulación mixta BBI PHV 201)

Número miembro	ID	ELISA acorde a la invención SP 4083/ SP 10 cada 1µg/ml	Prueba comercial anti-VHC (HP2)
5	PHV201-01	1:1000	1:128
10	PHV201-02	1:1000	1:500
	PHV201-03	1:128	1:32
	PHV201-04	negativo	negativo
	PHV201-05	1:64	1:64
15	PHV201-06	1:64	1:256
	PHV201-07	negativo	negativo
	PHV201-08	1:4	1:16
20	PHV201-09	1:1000	1:512
	PHV201-10	1:4	1:16
	PHV201-11	1:512	1:128
25	PHV201-12	1:32	1:16
	PHV201-13	1:256	1:256
	PHV201-14	1:64	1:64
	PHV201-15	1:512	1:1000
30	PHV201-16	1:512	1:512
	PHV201-17	1:128	1:256
	PHV201-18	1:16	1:128
35	PHV201-19	negativo	negativo
	PHV201-20	1:4	1:4
	PHV201-21	1:500	1:256
	PHV201-22	1:16	1:256
40	PHV201-23	1:256	1:512
	PHV201-24	1:256	1:512
	PHV201-25	1:1000	1:512

TABLA 14

Resultados de la evaluación de 930 donantes de sangre sanos, de los cuales se obtuvo, al mismo tiempo, suero y plasma

	especificidad en % tras la evaluación inicial	especificidad en % tras repetición
n = 930 sueros	99,5	99,7
n = 930 plasmas	99,6	99,7

Ejemplo 8

Preparación de soluciones de péptidos para generar mezclas de péptido acorde a la fórmula XIV con péptidos de las fórmulas XVIII, XIX, XX y XXII, así como revestimiento de placas de microtitulación con dicha mezcla de péptidos

Los polipéptidos SPH 9 (fórmula XVIII), SPH 20 (fórmula XIX), 4083 (fórmula XX) y SP 10 (fórmula XXII) se disolvieron en una concentración de 6 mg/ml en 50% (v/v) de ácido acético.

Estas 4 soluciones originales se mezclaron en base al volumen, en diferentes proporciones, como se describe en el ejemplo 4 y se disolvieron en 0,10 M de carbonato de sodio (pH 9,6) de modo que la concentración total de los polipéptidos fue de entre 0,2 y 8 µg/ml.

ES 2 255 068 T5

100 μ l de cada una de las soluciones se dispusieron en, respectivamente, 16 cavidades de placas de microtitulación, tipo B de Nunc, Roskilde, Dinamarca. Las placas de prueba llenadas fueron incubadas durante 18 horas a 20°C. Posteriormente, las soluciones fueron extraídas por aspiración de las cavidades y éstas fueron lavadas 3-4 veces con 300 μ l de una solución de 10 g/l de albúmina de suero vacuno en solución fisiológica de sal común amortiguada con fosfato, (PBS, pH 7,4) y las placas de prueba fueron secadas posteriormente con gel de sílice a 20°C.

Ejemplo 9

10 *Optimización de la concentración de péptidos de VIH 1, VIH 2 y VHC para la mezcla de revestimiento así como optimización de la determinación de ELISA y criterios de evaluación*

15 Comenzando con una relación en volumen de las cuatro soluciones de base descritas en el ejemplo 8, de 1:1:1:1 (V/V) las cuatro partes modificables fueron variadas independientemente entre sí, pero manteniendo constante las respectivas otras tres, para mantener, en la solución de revestimiento, las siguientes concentraciones finales de los péptidos individuales de VIH 1, VIH 2 y VHC (en μ g/ml):

	Péptido XVIII	Péptido XIX	Péptido XX	Péptido XXII
20	2	2	2	2
	1	2	2	2
	0,5	2	2	2
25	0,2	2	2	2
	0,1	2	2	2
	0,05	2	2	2
30	2	1	2	2
	2	0,5	2	2
	2	0,2	2	2
	2	0,1	2	2
35	2	0,05	2	2
	2	2	1	2
	...			
40	etc. hasta			
	0,05	0,05	0,05	0,05

45 Estas mezclas se fijaron, como se describe en el ejemplo 8, sobre placas de microtitulación y se evaluaron en ELISA como se describe en el ejemplo 4 y 5, asimismo, la concentración de los anticuerpos marcados con peroxidasa contra inmunoglobulina humana G también fue optimizada.

50 Las muestras con las cuales fue evaluada la optimización consistían en muestras de baja titulación anti-VIH 1, anti-VIH 2 y anti-VHC, obtenidas por diluciones seriales de los sueros humanos positivos correspondientes obtenidos en suero humano negativo. Asimismo también se evaluaron múltiples muestras anti-VIH y anti-VHC para poder definir la reacción de fondo (es decir, el enlace no específico en el caso de una placas de microtitulación revestida determinada).

55 Como criterio de selección se aplica una señal específica lo más elevada posible, es decir, una sensibilidad límite elevada en la determinación de la serie de titulación de muestras humanas anti-VIH o anti-VHC positivas y, al mismo tiempo, un fondo bajo en la evaluación de muestras anti-VIH y anti-VHC negativas.

Según estos criterios, en general se hallaron mezclas de revestimientos adecuadas de las cuales se seleccionaron las siguientes mezcla:

60	XXI	SPH	9	0,500 μ g/ml
		SPH	20	0,250 μ g/ml
		SP	4083	0,500 μ g/ml
65		SP	10	0,125 μ g/ml

ES 2 255 068 T5

5 Demostró ser adecuada una concentración de conjugado del ejemplo 2, de 1:3000 con una dilución final uniforme adicional de 1:26, asimismo, la realización de la prueba se llevó a cabo acorde al ejemplo 4.

5 A diferencia de las determinaciones de valores límite hasta ahora, en estas condiciones se clasificaron como muestras anti-VIH y/o anti-VHC positivas aquellas que presentan una extinción de 450 nm, mayor que el valor medio de los controles negativos más una adición del 0,250 O.D. (nueva determinación de valor límite).

Dicha determinación fue aplicada en los siguientes ejemplos 10 a 15 de manera uniforme e invariable.

10 Ejemplo 10

Determinación de anticuerpos humanos de la inmunoglobulina de la clase G contra VIH 1 VIH 2 y VHC en ELISA

15 Las muestras presentadas en las tablas 15-17 se describieron en el ejemplo 4 en condiciones optimizadas del ejemplo 9 con la mezcla de péptidos de la fórmula XIV. Teniendo en cuenta el anti-VIH 1 o 2 se compararon las reactividades del procedimiento acorde a la invención con una prueba combinada anti-VIH 1/2 (EnzygnostR Anti HIV 1/2, Behringwerke AG, HP 3). Para el control se utilizaron western blots adquiribles comercialmente (anti-VIH 1 y anti-VIH 2) de DuPont. VHC se detectó mediante dos diferentes procedimientos ELISA (HP 1 y HP 2).

20 Como lo indican los datos de las tablas 15 a 17, los anti-VIH 1 y anti-VIH 2 así como anti-VHC en muestras de origen humano son detectados de manera segura y fiable con el procedimiento acorde a la invención.

25 TABLA 15

Determinación de anti-VIH 1 con el procedimiento acorde a la invención, en comparación con una prueba combinada anti-VIH 1/2 (EnzygnostR Anti HIV 1/2, HP 3)

30 De reacción intensa significa con extinciones de > 2,5 en la evaluación fotométrica; todas las 76 muestras anti-VIH 1 positivas son VHC negativas.

Cantidad de muestras	origen de la muestra	procedimiento acorde a la invención	prueba combinada anti-VIH 1/2	comercial anti-VIH
n = 12 (anti-VIH 1 positiva)	Europa	n = 12 reacción intensa	n = 12 reacción intensa	
n = 57 (anti-VIH 1 pos.)	Africa Occidental	n = 57 reacción intensa	n = 57 reacción intensa	
n = 7 (anti-VIH 1/VIH 2 coinfecciones)	África Occidental	n = 7 reacción intensa	n = 7 reacción intensa	
n = 76		n = 76 positiva	n = 76 positiva	

ES 2 255 068 T5

TABLA 16

Determinación de anti-VIH 2 con el procedimiento acorde a la invención, en comparación con una prueba combinada anti-VIH 1/2 (EnzygnostR Anti HIV 1/2, HP 3)

5 De reacción intensa significa con extinciones de > 2,5 en la evaluación fotométrica; todas las 28 muestras anti-VIH 2 positivas son VHC negativas

Cantidad de muestras	origen de la muestra	de la invención	procedimiento acorde a la invención	prueba comercial combinada anti-VIH 1/2
n = 21	África Occidental	n = 21	reacción intensa	reacción intensa positiva
(anti-VIH 2 positiva) n = 7	África Occidental	n = 7	reacción intensa	reacción intensa
(anti-VIH 1/VIH 2 coinfecciones) n = 28		n = 28	reacción intensa positiva	reacción intensa positiva

TABLA 17

Detección de anti-VHC con el procedimiento acorde a la invención ELISA

30 Se identificaron como de reacción intensa las muestras que obtenían extinciones de > 2,500. Para las muestras de reactividad media se indican denominadas relaciones, entendiéndose por ello el cociente de extinción de la muestra respecto del corte de un ELISA dado. Los valores inferiores a 1,0 se denominan, correspondientemente, negativos. Los valores por encima de 1,0, se catalogan como positivos, asimismo, la reactividad es más intensa cuanto mayor sea una relación de valor; todas las muestras anti-VHC positivas son VIH negativas.

cantidad de muestras	de origen de las muestras	de las muestras	procedimiento acorde a la invención	ELISA comerciales anti-VHC	anti-VHC
n = 61	Europa	n = 57	reacción intensa	HP 1 n = 57	HP 2 n = 57
anti-VHC positiva	Europa	n = 4	> 9,0 ++	reacción intensa	reacción intensa
HC 90-346-351		n = 51	6,4 +	2,7 (+)	> 5,0 ++
-516		n = 51	6,8 +	negativa	3,9 +
-570		n = 51	6,9 +	negativa	5,0 +
n = 53	EEUU	n = 51	reacción intensa	1,9 (+)	> 5,0 +
anti-VHC positiva	EEUU	n = 2		n = 51	n = 51
EEUU	n = 2	n = 114	reacción intensa	reacción intensa	reacción intensa
HC 90-511-566	4,2 +	1,2 (+)		3,99 +	
n = 114		4,6 +		negativa	> 5,00 +
		n = 114	positiva	n = 111	n = 114
		positiva		positiva	positiva

ES 2 255 068 T5

Ejemplo 11

Determinación de la sensibilidad analítica de ELISA para anti-VIH y anti-VHC en comparación con el estado actual de la técnica

5 Para la evaluación de la sensibilidad analítica del ELISA acorde a la invención se obtuvieron titulaciones modelo de muestras positivas y se evaluaron en el ELISA descrito en el ejemplo 9. En total se obtuvieron diluciones de, respectivamente, tres sueros humanos anti-VIH 1 o anti-VIH 2 positivos en sueros anti-VIH y anti-VHC negativos y se definió la sensibilidad límite como la última dilución previa reactiva en el sistema de evaluación respectivo, utilizando el nuevo valor límite (valor medio de los controles negativos más 0,250 de threshold).

Los resultados de dicha prueba de sensibilidad límite están reunidos en las tabla 18 (anti-VIH 1), tabla 19 (anti-VIH 2) y tabla 20 (anti-VHC) como valores de extinción.

15 TABLA 18

Determinación de la sensibilidad límite del ELISA acorde a la invención respecto del anti-VIH 1, en comparación con una prueba combinada anti-VIH 1/2 (EnzygnostR Anti HIV 1/2)

20 Las tres muestras confirmadas anti-VIH 1 positivas fueron diluidas previamente en dos pasos con sueros humanos anti-VIH 1 y a VHC negativas y dichas diluciones dieron evaluadas acorde al ejemplo 3 o al folleto adjunto del fabricante de la prueba de evaluación. Todas las indicaciones representan valores de extinción (E_{450}). Todas las muestras a VIH positivas reaccionaron negativamente en HP 2.

Muestra	dilución previa	extinción del ELISA acorde a la invención	Extinciones de la prueba combinada anti-VIH 1/2 (HP3)
		corte=0,282 O.D.	corte=0,268 O.D.
8803/26	no diluida	> 2,500 +	> 2,500 +
anti-VIH 1 positiva	128	> 2,500 +	> 2,500 +
1 :			
	256	2,334 +	2,185 +
	512	1,408 +	1,412 +
40	1024	0,825 +	0,837 +
	2048	0,467 +	0,457 +
	4096	0,240	- 0,216 -
45	8000	0,137 -	0,135 -
8611/144	no diluida	> 2,500 +	> 2,500 +
anti-VIH 1 positiva	128	2,162 +	2,014 +
1 :			
50	256	1,366 +	1,028 +
	512	0,806 +	0,648 +
	1024	0,496 +	0,454 +
55	2048	0,280 -	0,258 -
	4096	0,153 -	0,136 -
	8000	0,088-	0,076 -
60	8803/24		
anti-VIH 1 positiva	400	1,632 +	1,585 +
1 :			
22281			
65	anti-VHC positiva	256	2,219 +
1 :			0,014 (negativa)

ES 2 255 068 T5

TABLA 19

Determinación de la sensibilidad límite del ELISA acorde a la invención respecto del anti-VIH 2, en comparación con una prueba combinada anti-VIH 1/2 (EnzygnostR Anti HIV 1/2)

5 Las tres muestras confirmadas anti-VIH 2 positivas fueron diluidas previamente en dos pasos con sueros humanos anti-VIH y a VHC negativas y dichas diluciones dieron evaluadas acorde al ejemplo 3 o al folleto adjunto del fabricante de la prueba de evaluación. Todas las indicaciones representan valores de extinción (E_{450}). Todas las muestras anti VIH positivas reaccionaron negativamente en el HP 2.

Muestra	dilución previa	extinción del ELISA acorde a la invención corte=0,282 O.D.	Extinciones de la prueba combinada anti-VIH 1/2 corte=0,268 O.D.
8804/103 anti-VIH positiva 1 :	no diluida 2 128	> 2,500 + > 2,500 +	> 2,500 + 2,500 +
	256	2,420 +	2,045 +
	512	1,488 +	1,339 +
	1024	0,737 +	0,705 +
	2048	0,365 +	0,385 +
	4000	0,196 -	0,190 -
8804/117 anti-VIH positiva 1 :	no diluida 2 128	> 2,500 + > 2,500 +	> 2,500 + > 2,500 +
	256	1,860	+ 1,902 +
	512	1,233	+ 1,100 +
	1024	0,656	+ 0,667 +
	2048	0,320 +	0,302 +
	4000	0,166 -	0,172 -
8804/116 anti-VIH positiva 1 :	2 400	1,045 +	1,020 +
22281 anti-VHC positiva 1 :	256	2,219 +	0,014 (negativa)

ES 2 255 068 T5

TABLA 20

Determinación de la sensibilidad límite del ELISA acorde a la invención respecto del anti-VHC

5 Las cuatro muestras confirmadas anti-VHC positivas fueron diluidas previamente en dos pasos con sueros humanos anti-VHC negativas y dichas diluciones fueron evaluadas acorde al ejemplo 3. Todas las indicaciones representan valores de extinción (E_{450} nm).

10	Muestra	dilución previa	extinción del ELISA acorde a la invención corte=0,270	ELISA comercial anti- VHC (HP2) corte=0,481
15	HC 90-85 anti-VHC positiva	no diluida	> 2,500 +	> 2,500 +
		1 : 16	> 2,500 +	> 2,500 +
		1 : 32	2,299 +	> 2,500 +
20		1 : 64	1,858 +	> 2,500 +
		1 : 128	1,515 +	> 2,500 +
		1 : 256	1,045 +	1,707 +
25		1 : 512	0,648 +	0,871 +
	1 : 1024	0,322 +	0,492 +	
	1 : 2048	0,207 -	0,255 -	
30	HC 90-225 anti-VHC positiva	no diluida	> 2,500 +	> 2,500 +
		1 : 16	> 2,500 +	> 2,500 +
		1 : 32	2,214 +	> 2,500 +
35		1 : 64	1,816 +	> 2,500 +
		1 : 128	1,488 +	2,008 +
		1 : 256	0,689 +	1,120 +
40		1 : 512	0,580 +	0,501 +
	1 : 1024	0,286 +	0,375 -	
	1 : 2048	0,148 -	0,111 -	
45	anti-VHC positiva			
	HC 90-270	1: 256	0,999 +	1,544 +
	HC 90-354	1: 128	0,971 +	0,761 +
50	anti-VIH 1 positiva			
	8803/26	no diluida	> 2,500 +	0,110 -
	8811/144	no diluida	> 2,500 +	0,098 -
55	8803/24	no diluida	> 2,500	+ 0,068 - (negativa)
	anti-VIH 2 positiva			
60	8804/103	no diluida	> 2,500	+ 0,075 -
	8804/117	no diluida	> 2,500	+ 0,081 -
	8804/116	no diluida	> 2,500	+ 0,099 - (negativa)

65

ES 2 255 068 T5

De manera análoga se efectuó la evaluación en el procedimiento anti-VHC, obteniendo series de dilución de cuatro muestras anti-VHC positivas, Como se describe en la tabla 20, y se evaluaron de manera análoga al anti-VIH y los resultados fueron comparados con el ELISA anti-VHC comercial, de segunda generación (HP 2).

5 De manera adicional, en las pruebas individuales también se evaluó la especificidad de las reactividades de los donantes individuales, por medio de análisis de las muestras anti-VIH 1 y anti-VIH 2 positivas, también sin diluir en la prueba anti-VHC así como a la inversa, las muestras anti-VHC positivas fueron analizadas en pruebas combinadas anti-VIH 1/2 (EnzygnostR Anti HIV 1/2).

10 Los resultados reunido en las tablas 18 a 20 dejan en claro que la sensibilidad límite de los ELISA acorde a la invención corresponde tanto en lo que respecta a anti-VIH 1 como así también a anti-VIH 2 a la sensibilidad límite de las pruebas combinadas de anti-VIH 1/2. La sensibilidad límite VHC del ELISA acorde a la invención también correspondía a la sensibilidad límite de un ELISA anti-VHC adquirible comercialmente (HP 2). Mientras que, sin embargo, acorde al estado actual de la técnica, para una detección de las especificidades de estos tres anticuerpos son necesarios, en total, al menos dos pruebas (pruebas combinadas anti-VIH 1/2 así como, al menos, una prueba anti-VHC),
15 dicha detección se logra con el procedimiento acorde a la invención de manera igualmente fiable y comparativamente sensible, en un solo ensayo de prueba.

20 Asimismo, se puede ver por los datos de la tabla 18 a 20 que la reacción intensa de las muestras anti-VIH y anti-VHC positivas en el nuevo ELISA es especialmente ventajosa, dado que las muestras anti-VIH reaccionan negativamente en la prueba anti-VHC y las muestras anti-VHC positivas, negativamente, en la prueba anti-VIH específica.

Ejemplo 12

25 *Determinación de muestras anti-VIH positivas de estadios infecciosos tempranos (seroconversiones) con el ELISA acorde a la invención*

30 Se evaluaron, en total, 3 pacientes, de los cuales, en momentos determinados, se tomaron muestras secuenciales de sangre, reiteradamente, durante el desarrollo de las fases muy tempranas de una infección de VIH 1. Este panel de suero se puede adquirir comercialmente (Boston Biomedica Inc., EEUU). En la tabla 21 se representaron los resultados obtenidos con el ELISA acorde a la invención en comparación con una prueba combinada anti-VIH 1/2.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 255 068 T5

TABLA 21

Todas las indicaciones son valores de extinción (E_{450} mm), asimismo, los valores por encima de los valores límite respectivos deben considerarse positivos

5	Código	de	ELISA	acorde	a	la	ELISA	anti-VIH	1/2	ELISA	anti-VHC
	muestras		invección				comercial			comercial (HP2)	
10	1 A		0,023				0,066			negativa	
	2 A		0,020				0,055			"	
	3 A		0,055				0,193			"	
	4 A		1,163 +				> 2,500 +			"	
15	5 A		> 2,500 +				> 2,500 +			"	
	6 A >		2,500 +				> 2,500 +			"	
	7 A		> 2,500 +				> 2,500 +			"	
20	8 A		> 2,500 +				> 2,500 +			"	
	9 A		> 2,500 +				> 2,500 +			"	
	1 C		0,014				0,022			negativa	
25	2 C		0,015				0,054			"	
	3 C		0,054				0,145			"	
	4 C		0,500 +				1,138 +			"	
	5 C		0,630 +				1,707 +			"	
30	6 C		0,889 +				> 2,500 +			"	
	7 C		0,942 +				"			"	
	8 C		1,010 +				"			"	
35	9 C		1,081 +				"			"	
	10 C		1,564 +				"			"	
	11 C		> 2,500 +				"			"	
	12 C		"				"			"	
40	13 C		"				"			"	
	14 C		"				"			"	
	15 C		"				"			"	
45	16 C		"				"			"	
	17 C		"				"			"	
	18 C		"				"			"	
	G BBI										
50	80		0,012				0,056			negativa	
	81		0,013				0,053			"	
	82		0,018				0,059			"	
55	83		0,478 +				1,112 +			"	
	84		0,733 +				> 2,500 +			"	
	85		0,612 +				> 2,500 +			"	
60	86		0,763 +				> 2,500 +			"	
	87		1,296 +				> 2,500 +			"	
	88		1,309 +				> 2,500 +			"	
	89		1,544 +				> 2,500 +			"	
65	valor límite		0,281				0,285			0,481	

ES 2 255 068 T5

Los resultados de la tabla 21 permiten ver que el ELISA acorde a la invención detecta las muestras anti-VIH 1 positivas de baja titulación con la misma fiabilidad que la prueba combinada anti-VIH 1/2 (EnzygnostR Anti HIV 1/2). Del mismo modo, se puede observar a partir de la comparación con los datos de la tabla 21 que también el momento más temprano en el cual se logra la primera detección de anticuerpos de VIH 1 específicos con el nuevo ELISA con péptidos, es posible, al menos, tan temprano como con la prueba singular específica anti-VIH 1 del estado actual de la técnica.

Ejemplo 13

Determinación de muestras anti-VIH positivas de baja titulación con el ELISA acorde a la invención

En la tabla 22 están resumidos los resultados obtenidos con la evaluación de un "Anti HIV low titre - Panel" (panel anti-VHC de baja titulación)adquirible comercialmente, con el nuevo ELISA con péptidos VIH/VHC, en comparación con una prueba combinada anti-VIH 1/2 (EnzygnostR anti-VIH 1/2).

El panel de muestras de la empresa Boston Biomedica, Inc., EEUU, comprende un total de 15 muestras, calificadas mediante métodos de determinación de anti-VIH 1 como anti-VIH 1 de baja titulación positivas.

TABLA 22

Resultados de la evaluación del "low titre Anti HIV 1-Panel" (panel anti-VHC de baja titulación) de Boston Biomedica Inc., EEUU

Todas las indicaciones son valores de extinción con una longitud de onda de 450 nm. Los valores por encima del valor límite indicado son positivos.

Número de ID	ELISA acorde a la invención	ELISA anti-VIH 1/2 comercial	ELISA VHC comercial	Elisa anti-VHC
BO 1-01	> 2,500	1,872	> 2,500 +	
02	1,979	1,575	2.023 +	
03	2,056	2,280	negativa	
04	1,751	1,960	"	
05	1,781	2,044	"	
06	1,428	1,728	"	
07	1,183	1,564	"	
08	0,641	1,152	"	
09	0,984	1,499	"	
10	0,682	0,940	"	
11	1,302	1,650	"	
12	2,032	0,540	1,833 +	
13	1,017	1,854	negativa	
14	1,079	1,484	"	
15	> 2,500	2,090	> 2,500 +	
corde	0,279	0,265	0,479	

Como se puede ver en los resultados de la tabla 22, en comparación con las pruebas combinadas anti-VIH 1/2 (EnzygnostR Anti HIV 1/2) con el ELISA con péptidos VIH/VHC, acorde a la invención, todas las muestras se determinaron como igualmente reactivas.

Es interesante que con el nuevo ELISA con péptidos VIH/VHC acorde a la invención, cuatro muestras del panel fueron detectadas incluso con mayor intensidad reactiva en comparación con las pruebas combinadas anti-VIH 1/2 (EnzygnostR Anti HIV 1/2) (números 1, 2, 12 y 15). Las evaluaciones adicionales de dichas muestras arrojaron como resultado, al mismo tiempo, anticuerpos de VHC presentes, lo cual confirma nuevamente la fiabilidad de una detección no diferenciada de anti-VIH 1/VIH 2 y VHC según el procedimiento acorde a la invención.

ES 2 255 068 T5

Ejemplo 14

Determinación de muestras anti-VHC positivas de baja titulación con el ELISA acorde a la invención

5 La tabla 23 contiene los resultados obtenidos con el nuevo ELISA con péptidos VIH 1/VIH 2 y VHC y el low titre Anti HCV-Panel de Boston Biomedica Inc., EEUU. En esta tabla también se encuentran los datos relevados en el mismo panel mediante un ELISA anti-VHC moderno (HP 2).

10

TABLA 23

BBI Low titre Anti HCV PANEL PHV 101 (Panel anti-VHC de baja titulación BBI VPH 101)

15

Número I.D. miembro	ELISA acorde a la invención	Prueba comercial anti-VHC (HP 2)
VPH101-01	1 : 16	1 : 2
VPH101-02	negativo	negativo
20 VPH101-03	1 : 4	1 : 1
VPH101-04	1 : 512	1 : 64
VPH101-05	1 : 2	1 : 1
25 VPH101-06	1 : 128	1 : 32
VPH101-07	1 : 128	1 : 128
VPH101-08	1 : 64	1 : 16
VPH101-09	1 : 64	1 : 16
30 VPH101-10	1 : 256	1 : 128
VPH101-11	1 : 32	1 : 16
VPH101-12	1 : 512	1 : 128
35 VPH101-13	1 : 16	1 : 64
VPH101-14	1 : 64	1 : 32
VPH101-15	1 : 128	1 : 64

40

Las indicaciones respecto del ELISA HP 2 acorde a la invención y comercial representan los denominados títulos de punto final, con los cuales se define la mayor dilución previa de un suero en un suero anti-VHC negativo detectada en una prueba determinada de manera reproducible y positiva.

45

Los resultados de la tabla 23 permiten observar que con el ELISA acorde a la invención la totalidad de las 14 muestras positivas se determinaron positivas de manera fiable. A su vez es llamativo que la intensidad de señal sea tan elevado, lo cual se debe a una elevada reactividad.

50

Esta elevada reactividad se refleja en las sensibilidades límite determinadas de la tabla 23. Dichos límites de detección fueron definidos diluyendo previamente las muestras humanas en dos pasos en suero anti-VHC negativo y evaluando luego, acorde al ejemplo 4, asimismo, el último paso de dilución previa aún reactivo representa la denominada titulación final.

55

A partir de esta base, los datos de la tabla 23 demuestran que el nuevo ELISA con péptidos VIH 1/VIH 2/VHC en el panel VPH 101 presenta, incluso un mejor límite de determinación en relación con el anti-VHC que el estado actual de la técnica.

60 Ejemplo 15

Determinación de la cuota de reacciones no específicas del nuevo ELISA con péptidos en un colectivo de donantes sanos

65

Para la determinación de la frecuencia de las reacciones no específicas que en el ELISA conducen a resultados falsos, se tomaron un total de $n = 512$ donantes sanos. De estos donantes se obtuvo, al mismo tiempo, suero y plasma, para poder analizar una posible influencia negativa del sistema de coagulante en el procedimiento.

ES 2 255 068 T5

Las muestras reactivas en una de estas tres pruebas (ELISA acorde a la invención, ELISA anti-VHC HP 2 y a VIH 1/2 HP 3) (la denominada prueba inicial) se reiteraron en la misma prueba (el denominado retesting o nueva prueba) y se analizaron con reactividad reproducible en el análisis Western blot anti-VIH 1 y ELISA anti-VHC (HP 1) como procedimiento comparativo.

Ninguna muestra que resultó reactiva en este rastreo en uno de los tres ELISA Pudo ser confirmada mediante este procedimiento de confirmación como anti-VIH 1 o como anti-VHC positiva. Todas las muestras clasificadas en el rastreo, se catalogaron como falsas positivas en los respectivos procedimientos.

TABLA 24

Rastreo de 512 donantes de sangre sanos, de los cuales se obtuvieron, al mismo tiempo, 512 sueros y 512 de los denominados "plasmas pareados". Se indican los hallazgos según la evaluación inicial; para los resultados de la nueva prueba, véase la Tabla 25

Códigos de muestras	Procedimiento acorde a la invención		anti-VIH 1/2		anti-VHC (HP 2)	
	cantidad de sueros/plasmas reactivos	relaciones sueros/plasmas	cantidad de sueros/plasmas reactivos	relaciones sueros/plasmas	cantidad de sueros/plasmas reactivos	relaciones sueros/plasmas
	3 / 2		0 / 0		0 / 0	
9104-PE-1		2,1 / 1,3		neg.		neg.
	2		1,0 / 1,2	neg.		neg.
	3		1,1 / 0,9 -	neg.		neg.
	0 / 0		1 / 1			
9104-VIH-1		neg.		1,8 / 1,6		neg.
	0 / 0		0 / 0		5 / 4	
9104-VHC-1		neg.		neg.		>4,0 / 3,5
	2	neg.		neg.		2, 5 / 3,0
	3	neg.		neg.		1,4 / 1,2
	4	neg.		neg.		1,3 / 1,5
	5	neg.		neg.		0,8 - /1,1

ES 2 255 068 T5

TABLA 25

Resultados de la especificidad tras evaluación reiterada de los 9 sueros reactivos de la tabla 24

5	n = 512 sueros	nuevo ELISA con péptidos	anti-VIH 1/2 (HP 3)	anti-VHC (HP 2)
10	y n = 512 plasmas pareados de un total de 512 donantes sanos	suero/plasma	suero/plasma	suero/plasma
15	Cantidad de resultados positivos falsos prueba inicial	3 / 2	1 / 1	5 / 4
20	Especificidad inicial (%)	99,41 / 99,60	99,80 / 99,80	99,02 / 99,22
	Cantidad de resultados positivos falsos tras repetición	2 / 2	1 / 1	4 / 4
	Especificidad de la nueva prueba (retesting) (%)	99,60 / 99,60	99,80 / 99,80	99,22 / 99,22

Los resultados de dicha serie de pruebas están resumidos en la tabla 24. Mientras que según el procedimiento acorde a la invención tres sueros (y dos plasmas correspondientes) fueron reactivos, con un ELISA 1 anti-VIH 1/2 se determinó como reactivo un suero (y un correspondiente plasma) y con el ELISA anti-VHC se determinaron como reactivos cinco sueros (y cuatro plasmas correspondientes). Los donantes reactivos en el ELISA correspondiente no eran idénticos.

Tras de una realización repetida de la prueba de estos nueve sueros reactivos, se obtuvo la imagen representada en la Tabla 25 de dos sueros (dos plasmas pareados) que en el ELISA con péptidos acorde a la invención fueron reactivos en la nueva prueba, un suero (un plasma "pareado") era reactivo en el ELISA anti-VIH 1/2, así como cuatro sueros (cuatro plasmas pareados) reactivos en el ELISA anti-VHC.

Tomando como base que ninguna de estas muestras pudo ser confirmada como anti-VIH y/o anti-VHC positiva, se determinaron los datos de especificidad representados en la Tabla 25 para cada uno de los ELISA analizados, así como para sueros y plasmas, calculando la proporción porcentual de las muestras determinadas correctamente como negativas (en total, cada 512 sueros y plasmas).

Basados en los datos de la Tabla 25, de acuerdo con el estado actual de la técnica, se deberían haber excluido en total cinco donantes (examen obligatorio para cada donación de anti-VIH y anti-VHC): un donante reiteradamente falso positivo en la prueba anti-VIH 1/2 y cuatro donantes reiteradamente falsos positivos en la prueba anti-VHC. A diferencia de ello, el número de los donantes que pueden ser determinados como falsos reactivos en el ELISA acorde a la invención es de solamente dos.

Resumiendo, se puede decir que el nuevo ELISA con péptidos para la detección no diferencial de anti-VIH 1, anti-VIH 2 y anti-VHC, con en relación con los criterios actualmente vigentes de la sensibilidad corresponde, al menos, a las respectivas características de rendimiento de las dos pruebas individuales anti-VIH 1/2, por una parte, y anti-VHC, por otra parte: Los datos de la evaluación de paneles, es decir, muestras nativas que contienen anti-VIH1 y/anti-VIH 2 y/o anti-VHC remiten, asimismo, a una eficacia equiparable a la evaluación de las sensibilidades límites y el momento de reconocimiento más temprano de muestras anti-VIH 1 y/o anti-VIH 2 y/o anti-VHC de baja titulación. Mientras que la detección de estas tres especificidades de anticuerpos acorde al estado actual de la técnica, de este modo sólo es posible con tres pruebas diferentes o, teniendo en cuenta la prueba combinada anti-VIH 1/2, con dos pruebas diferentes, el ELISA acorde a la invención ofrece la ventaja de requerir sólo una prueba, con la misma eficacia. Precisamente para los bancos de sangre, obligados a realizar una prueba de anti-VIH 1, anti-VIH 2 y anti-VHC, el nuevo ELISA con péptidos significa una considerable reducción de complejidad y gastos con, al menos, la misma fiabilidad y seguridad en la determinación de anti-VIH 1, anti-VIH 2 y anti-VHC.

Se descubrió, además, de manera totalmente sorprendente, en la determinación de la propensión a perturbaciones de esta nueva prueba, que, gracias a la muy buena especificidad, es decir, a sólo un número reducido de falsos resultados positivos, se requiere de menos pruebas posteriores, así como menos pruebas de confirmación y también se deben excluir menos donantes que en el modo de proceder de rastreo habitual, utilizando una prueba anti-VIH 1/2 y, por separado, una prueba anti-VHC. Con ello, el procedimiento acorde a la invención ofrece ventajas económicas y técnicas que también son brindadas por otras constelaciones de péptidos de VIH y VHC de las fórmulas IV a XII o XIII a XVII.

También para otras cuestiones en las cuales la sensibilidad límite máxima optimizada juega el papel más importante, el procedimiento acorde a la invención es totalmente adecuado. En otras condiciones de prueba o, por ejemplo,

ES 2 255 068 T5

mediante el cálculo, se puede demostrar en los ejemplos 10 a 14 que ciertamente es posible crear características de sensibilidad del procedimiento acorde a la invención significativamente mejores que las del estado actual de la técnica, si se toleran datos de especificidad algo más desfavorables, los cuales, sin embargo, siguen correspondiendo todavía al estado actual de la técnica.

5

Si, por ejemplo, el valor límite (ejemplo 9) se redujera a 0,1 de extinción, todas las sensibilidades límites se mejorarían considerablemente para anti-VIH 1, anti-VIH 2 y anti-VHC, en un factor de, al menos, 2. Para la cuota de las muestras que reaccionan de forma no específica, es decir, muestras positivas falsas en el rastreo de los donantes de sangre sanos (ejemplo 15) se obtendría un total de cinco donantes determinados reiteradas veces como reactivos, lo cual corresponde absolutamente al resultado procedente de ambas pruebas individuales, asimismo, se ha mejorado esencialmente la sensibilidad de la detección de anticuerpos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Mezcla de un péptido del grupo A (región del núcleo del VHC), conformado por el péptido:

5

1 30
MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFFGGGQI SP 10

10

y un péptido del grupo B (región de las proteínas no estructurales del VHC), conformado por el péptido:

4083:

15

121 175
SGKPAIIPDREVLRYREFDEMEEC SQHLPYIEQGMMLAEQFKQKALGLLQTASRQA

20

2. Mezcla acorde a la reivindicación 1, **caracterizada** porque la secuencia de aminoácidos de los péptidos respecto de la secuencia natural está modificada por reemplazo de uno o múltiples aminoácidos de tal modo que su reactividad inmune se mantenga esencialmente, o se mejore, y, en la cual, el reemplazo está limitado al intercambio mutuo dentro de los siguientes agrupamientos separados por punto y coma: Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; Phe, Tyr; Ala, Ser; Ala, Thr; Ala, Val; Ala, Pro; Ala, Glu; Leu, Gln; Gly, Phe; Ile, Ser; Ile, Met.

25

3. Mezclas acordes a, al menos, una de las reivindicaciones 1 o 2, en las cuales los péptidos pueden ser modificados por adición de una secuencia hidrófoba que consiste en 2 a 20 aminoácidos hidrófobos.

4. Mezclas acordes a la reivindicación 3, en las cuales la secuencia adicional es la siguiente: Phe-Ala-Phe-Ala-Phe.

30

5. Mezcla acorde a, al menos, una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque los péptidos están enlazados entre sí.

35

6. Mezcla acorde a, al menos, una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque los péptidos están unidos a un portador.

7. Secuencias de ADN que codifican para los péptidos de una mezcla para, al menos, una de las reivindicaciones 1-6.

40

8. Procedimiento inmunoquímico para detectar y/o determinar anticuerpos de VHC, utilizando mezclas de péptidos como antígeno, **caracterizado** porque dichas mezclas de péptidos son acordes a, al menos, una de las reivindicaciones 1-6.

45

9. Procedimiento analítico para detectar y/o determinar VHC, **caracterizado** porque como paso específico, se implementa una reacción de hibridación en la cual se utilizan sondas de ácido nucleico que en su parte específica son complementarias de las secuencias de ADN acorde a la reivindicación 7.

50

10. Procedimiento para la preparación de un agente que contiene mezclas acorde a, al menos, una de las reivindicaciones 1-6, para ser utilizado como inmunógeno para generar anticuerpos en mamíferos, especialmente, en seres humanos.

11. Mezcla de péptidos acorde a la reivindicación 1, **caracterizada** porque los péptidos son sintetizados mediante química de péptidos.

55

12. Procedimiento acorde a la reivindicación 8, en el cual la mezcla de péptidos está fijada en un soporte.

60

13. Procedimiento acorde a la reivindicación 12, **caracterizado** porque el soporte está seleccionado entre el grupo conformado por poliestireno, cloruro de polivinilo, poliamida y otros polímeros sintéticos, polímeros naturales, como celulosa, así como polímeros naturales derivatizados, como acetato de celulosa y nitrocelulosa, así como vidrio, especialmente, fibras de vidrio.

14. Procedimiento acorde a la reivindicación 13, **caracterizado** porque el soporte es poliestireno.

65

15. Procedimiento acorde a una de las reivindicaciones 12-14, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante anticuerpos marcados con enzimas, marcados con fluorescencia, con quimioluminiscencia, con biotina o radioactivamente, contra anticuerpos enlazados al epítopo.

ES 2 255 068 T5

16. Prueba acorde a la reivindicación 9, **caracterizada** porque como anticuerpo marcado con enzimas se utilizan enzimas de fosfatasas y/o peroxidasas de rábano.

5 17. Kit de prueba que contiene un soporte en el cual están fijadas las mezclas de péptidos acorde a, al menos, una de las reivindicaciones 1-6.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 255 068 T5

FIG 1 Secuencia primaria de los aminoácidos de la región ORF de C-100-3

AS 1

D A H F L S Q T K Q S G E N L P Y L V A	20
Y Q A T V C A R A Q A P P P S W D Q M W	40
K C L I R L K P T L H G P T P L L Y R L	60
G A V Q N E I T L T H P V T K Y I M T C	80
M S A D L E V V T S T W V L V G G V L A	100

A L A A Y C L S T G C V V I V G R V V L	120
S G K P A I I P D R E V L Y R E F D E M	140
E E C S Q H L P Y I E Q G M M L A E Q F	160
K Q K A L G L L Q T A S R Q A E V I A P	180
A V Q T N W Q K L E T F W A K H M W N F	200

I S G I Q Y L A G L S T L P G N P A I A	220
S L M A F T A A V T S P L T T S Q T L L	240
F N I L G G W V A A Q L A A P G A A T A	260
F V G A G L A G A A I G S V G L G K V L	280
I D I L A G Y G A G V A G A L V A F K I	300

M S G E V P S T E D L V N L L P A I L S	320
P G A L V V G V V C A A I L R R H V G P	340
G E G A V Q W M N R L I A F A S R G N H	360
V S P	

AS 363

Figura 2: Comparación de las secuencias de las fórmulas I y II acorde a la invención, con péptidos conocidos de la región ORF de C-100-3

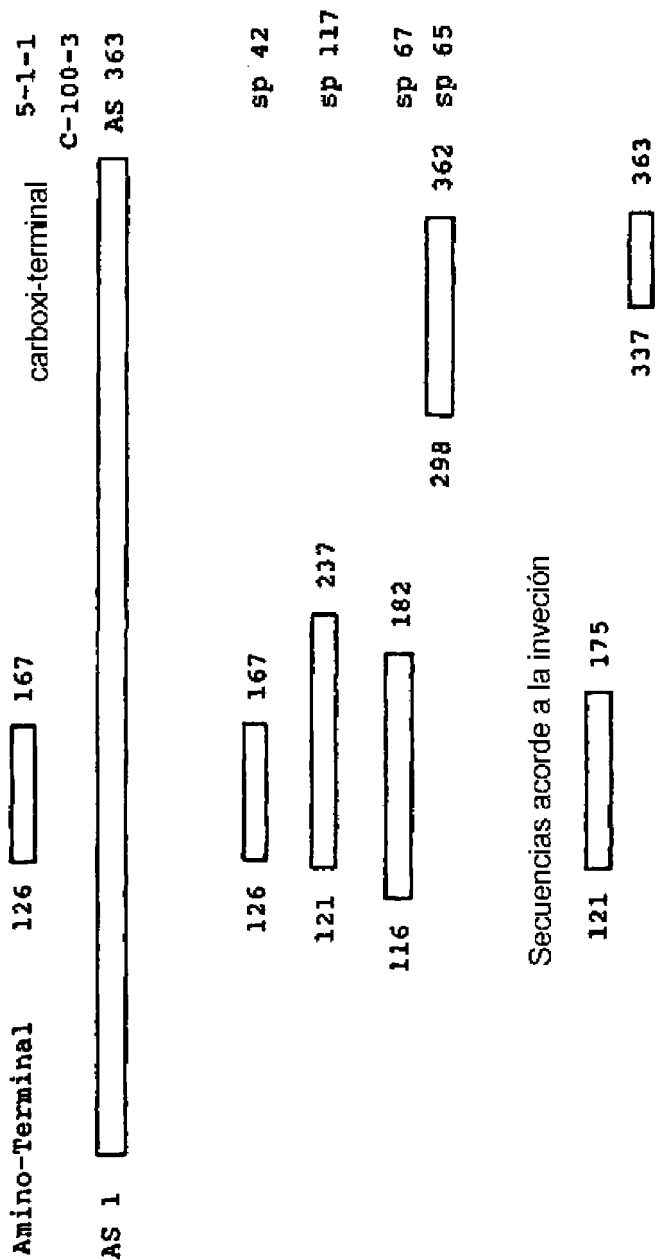


Figura 3: comparación de las secuencias acorde a la invención de la proteína del núcleo del VHC con péptidos conocidos

