



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 187 947**

⑤① Int. Cl.⁷: G01N 33/569

C07K 16/10

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **98912441.7**

⑧⑥ Fecha de presentación: **05.03.1998**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 972 198**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2000**

⑤④ Título: **Procedimiento para la determinación simultánea de antígenos de HIV y anticuerpos de HIV.**

③⑩ Prioridad: **10.03.1997 DE 197 09 762**
01.07.1997 DE 197 27 943

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.06.2003

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.06.2003

⑦③ Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**
68298 Mannheim, DE

⑦② Inventor/es: **Donie, Frederic;**
Faatz, Elke;
Upmeier, Barbara;
Hoess, Eva;
Saman, Eric y
Buyse, Marie-Ange

⑦④ Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

DESCRIPCION

Procedimiento para la determinación simultánea de antígenos de HIV y anticuerpos de HIV.

5 El invento se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de una infección causada por un HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) mediante un ensayo inmunológico por la detección específica de antígenos de HIV y anticuerpos de HIV.

10 El SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) es una enfermedad de debilidad inmunitaria heredada, que es causada por el virus HIV. Hasta ahora se conocen como agentes patógenos las cepas HIV1 y HIV2. Ambas cepas se asemejan, en lo que se refiere a la morfología, al tropismo celular, a la interacción con el receptor de CD4 de células T, al efecto citopático *in vitro* sobre células CD4, a la estructura genómica general, y a la capacidad de provocar la enfermedad del SIDA (Clavel, 1987, AIDS 1, 135-140). No obstante, el grado de afinidad inmunológica es pequeño, por lo que los anticuerpos específicos para 15 un HIV1 no muestran por lo general ninguna reacción cruzada con un HIV2. Junto a los subtipos más propagados del grupo M de HIV1, se conoce todavía otro subtipo de HIV1, el subtipo O (SubO) (Myers y colaboradores, Banco de Datos de Los Álamos, 1994; Sharp y colaboradores, AIDS suplemento 8, páginas S27-S42, 1994). El grado de afinidad entre el HIV1-SubO y un HIV1 es esencialmente mayor que entre el HIV1-SubO y un HIV2. No obstante, los anticuerpos, que están dirigidos contra un HIV1 reaccionan de 20 modo cruzado solamente en parte con el correspondiente antígeno del HIV1-SubO. También, una gran parte de los anticuerpos específicos para el HIV1-SubO no reacciona con los antígenos del grupo M de HIV1.

25 La evolución de una infección por HIV se puede clasificar en varias fases relevantes para el diagnóstico. En la fase temprana de la infección ya se pueden detectar antígenos de HIV, pero todavía no se pueden detectar anticuerpos de HIV. En la fase de la seroconversión, los antígenos de HIV pueden ser detectados de un modo débilmente positivo o negativo, es decir pueden no ser detectables. Los anticuerpos de HIV de la clase IgM son detectables en esta fase. Por el contrario, los anticuerpos de HIV de la clase IgG no son positivos o son sólo débilmente positivos. En la siguiente fase, sin síntomas, se pueden detectar prin- 30 cipalmente anticuerpos de HIV del tipo IgG, mientras que no aparece por regla general ningún antígeno de HIV. Lo mismo es válido para la evolución progresiva de la enfermedad en la fase clínica.

35 En la fase tardía de la enfermedad, finalmente, los anticuerpos de HIV se pueden hacer débilmente positivos o negativos, mientras que los antígenos de HIV, o bien permanecen negativos o por causa de la pérdida de carga con virus, cuando se desmorona el sistema inmunitario del paciente, se pueden detectar de nuevo como positivo. En estas diferentes fases de la enfermedad, cuyas evoluciones pueden diferenciarse en gran manera dependiendo de cada paciente, sigue habiendo por consiguiente siempre momentos, en los que las detecciones, ya sea de antígenos o de anticuerpos, pueden proporcionar valores falsamente 40 negativos.

45 Para la detección de infecciones con HIV1, HIV2 ó HIV1-SubO se llevan a realización con frecuencia sistemas de ensayo en cuanto a anticuerpos (IgG e IgM) en el formato de un sistema de ensayo de puente, que se describe por ejemplo en el documento de solicitud de patente europea EP-A-0.280.211. Como antígenos se emplean para ello por lo general los antígenos de la denominada región de envoltura 50 (env), esto es los gp160, gp120, gp41 para los HIV1 y HIV1-SubO y los gp140, gp110, gp36 para los HIV2, conjuntamente con el antígeno p24 (de HIV1), a base del que está constituido el núcleo del virus, o respectivamente el p26 (de HIV2). Los antígenos p24 y p26, respectivamente, son codificados por la determinada región gag. Estos sistemas de ensayo proporcionan entonces una señal positiva cuando en la muestra están presentes anticuerpos contra los mencionados antígenos. En las fases temprana y tardía de la enfermedad, cuando está presente un antígeno p24 ó p26 libre, sucede con frecuencia que no se pueden detectar anticuerpos algunos, puesto que o bien el sistema inmunitario del paciente todavía no ha formado suficiente cantidad de anticuerpos, o se ha agotado de tal manera que ya no se forman suficientes anticuerpos para poder detectar a éstos.

55 Los sistemas de ensayo para determinar antígenos para la detección de un antígeno p24 se llevan a cabo por lo general de manera separada con respecto de los sistemas de ensayo para determinar anticuerpos. Solamente en la fase temprana de la infección y en la fase final del SIDA ha aumentado el título de antígenos en el paciente, de manera tal que solamente en estas fases se puede detectar con seguridad el p24. 60

Una desventaja de los sistemas de ensayo hasta ahora conocidos consiste en que ninguno de los sistemas de ensayo, considerado por sí solo, cubre todo el período de tiempo de una infección por un HIV,

que es relevante para el diagnóstico.

Con ayuda de sistemas combinados de ensayo (Kombitests) se pueden detectar antígenos de un determinado patógeno y anticuerpos contra el mismo patógeno. Un procedimiento de este tipo para la determinación simultánea de antígenos y anticuerpos se divulga en el documento de solicitud de patente alemana DE 42 36 189 A1. No se describe sin embargo un enfoque de solución para abarcar por diagnóstico, sin omisiones, todas las fases de una infección de HIV.

En el documento de solicitud de patente internacional WO 93/21346 se describe un sistema combinado de ensayo para la detección simultánea del antígeno p24 de HIV, y de los anticuerpos gp41 de HIV1 y gp36 de HIV2 (en ambos casos, anticuerpos contra proteínas del gen de env) mediante un ensayo inmunológico heterogéneo. Con este sistema de ensayo, sin embargo, muestras positivas en cuanto a HIV, que no contienen ningún p24 o ningún anticuerpo contra las proteínas env, no son abarcadas como positivas. Solamente con el gp41 no se pueden reconocer todas las muestras de HIV1 que son positivas en cuanto a anticuerpos, puesto que están ampliamente propagadas las muestras, que están caracterizadas porque ellas en la transferencia de borrón Western presentan solamente un incompleto diseño o modelo de bandas y no muestran ninguna coloración de la banda de gp41.

Hashida y colaboradores (1996, J. Clin. Lab. Anal. 10, 213-219) describen un sistema de ensayo de diagnóstico para la detección de infecciones causadas por un HIV1. En este sistema de ensayo se detectan al mismo tiempo el antígeno p24, anticuerpos IgG contra p17 (procedentes de la región gag) y anticuerpos IgG contra la transcriptasa inversa (RT, de *Reverse Transcriptase*), que es codificada por el gen pol. Con esta realización del sistema de ensayo es posible sin embargo solamente la detección de infecciones causadas por el HIV1. Además, no se abarcan sueros de seroconversión, que solamente contienen anticuerpos IgM débilmente afines contra los dos antígenos arriba utilizados. Además de ello, no se abarcan sueros de seroconversión, que contienen anticuerpos contra las proteínas de env. Después de la disminución del título de antígenos de HIV en la fase temprana de la infección, aparecen con frecuencia solamente anticuerpos IgM contra la proteína de env gp41. En este caso, el sistema de ensayo de Hashida y colaboradores muestra un resultado falsamente negativo.

En el estado de la técnica no existe hasta el momento actual ningún sistema de ensayo de diagnóstico, con el que sea posible de una manera confiable la detección simultánea de HIV1, HIV1-SubO y HIV2 sin omisiones para todos los estadios de una infección.

Por lo tanto, era una misión la de desarrollar un sistema mejorado de ensayo en cuanto a infecciones causadas por los HIV, que haga posible detectar de manera correcta, confiable y sin omisiones como sistema de ensayo único todas las fases abarcables por diagnóstico de una infección causada por los HIV. El sistema de ensayo debería hacer posible la determinación simultánea de los HIV1, HIV1-SubO y HIV2.

El problema planteado por esta misión se resuelve mediante el procedimiento conforme al invento para el diagnóstico de una infección causada por los HIV, mediante un ensayo inmunológico por la detección específica del antígeno p-24 de HIV1, HIV1-SubO y/o del antígeno p26 de HIV2, por lo menos de un anticuerpo contra la región env de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 y por lo menos de un anticuerpo contra las regiones pol y/o gag de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2, realizándose que la región gag no abarca secuencias de los p24/p26. Con ayuda del procedimiento conforme al invento es posible detectar con seguridad la infección causada por los HIV ya al aparecer solamente uno de los analitos antes señalados.

De modo sorprendente, se ha puesto de manifiesto que mediante la detección de anticuerpos contra un producto de genes, en particular de la región pol de los HIV en combinación con la detección del antígeno p24 de HIV1, HIV-SubO y/o del antígeno p26 de HIV2, y con la detección de por lo menos un anticuerpo contra la región env de los HIV, se puede suprimir la omisión (cerrar el vacío) de diagnóstico que hasta ahora se lamentaba. Sorprendentemente, se ha manifestado como apropiado un procedimiento para la detección de una infección causada por los HIV, en el que se detectan anticuerpos contra la transcriptasa inversa (RT de *Reverse Transcriptase*) de los HIV, en combinación con la detección del antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o del antígeno p26 de HIV2, y con la detección de por lo menos un anticuerpo contra la región env de los HIV.

La detección de una infección causada por los HIV mediante el sistema combinado de ensayo conforme al invento por medio de la determinación de los parámetros individuales mencionados, se efectúa de una manera simultánea. La denominación de "sistema combinado de ensayo" significa que se pueden detectar al mismo tiempo antígenos de HIV y anticuerpos que están dirigidos contra antígenos de HIV. Con ayuda de este sistema de ensayo se pueden abarcar con seguridad todos los estadios de una infección

causada por los HIV. Mediante la elección conforme al invento de antígenos y respectivamente anticuerpos a ensayar y de los correspondientes receptores que se fijan específicamente, es posible llevar a cabo el procedimiento conforme al invento. Además, es posible la detección de los HIV1, HIV1-SubO y HIV2 con un único sistema de ensayo. Además de ello, mediante una elección apropiada de receptores es posible un amplio reconocimiento de subtipos de HIV1 del grupo M de HIV1. El sistema de ensayo se basa de modo preferente en el principio del ensayo inmunológico heterogéneo. Sin embargo, son concebibles también realizaciones homogéneas de los sistemas de ensayo, tales como por ejemplo sistemas de ensayo turbidimétricos, en los que no se efectúa ninguna separación entre una fase sólida y una fase líquida.

Conforme al invento, en el procedimiento de detección se emplean como receptores R1 y R2 los que se fijan de manera específica al antígeno p24 de HIV1 y/o al antígeno p26 de HIV2, que se han de determinar. Como receptores R3 y R4 se utilizan uno o varios antígenos procedentes de la región env de HIV1, HIV2 ó HIV1-SubO (gp160, gp120, gp41 para HIV1 y HIV1-SubO y gp140, gp110, gp36 para HIV2). De modo preferido se utilizan como receptores R3 y R4 los gp41 y/o gp36 o fragmentos de ellos. Como receptores R5 y R6 se utilizan uno o varios antígenos procedentes de la región pol ó gag de HIV1, HIV2 o HIV1-SubO, no debiendo éstos ser epítomos o secuencias del p24 ó p26, que pueden reaccionar con los receptores R1 ó R2. De modo preferido, se emplean como R5 y R6 los antígenos procedentes de la región pol de HIV1, HIV2, ó HIV1-SubO. De modo especialmente preferido, como receptores R5 y R6 se utiliza la transcriptasa inversa (RT).

Mediante la combinación conforme al invento de receptores es posible detectar con seguridad todos los estadios de la infección causada por los HIV. Con ello se detectan tanto analitos específicos para los HIV, que están presentes solamente en la fase temprana o tardía de la infección (p.ej. los antígenos p24 ó p26 respectivamente), como también analitos que aparecen en la fase sin síntomas y son detectables durante un prolongado período de tiempo, tales como por ejemplo anticuerpos contra los productos de genes de env gp160, gp120 ó gp41 y anticuerpos contra los productos de genes de pol, transcriptasa inversa, integrasa o proteasa, o anticuerpos contra los productos de genes de gag p17 ó p15.

Mediante elección apropiada de los receptores, caso de que se desee, se pueden detectar con un único sistema de ensayo infecciones causadas por los HIV1, HIV2 y HIV1-SubO, inclusive todos los subtipos del grupo M de HIV1. Para tal realización de los sistemas de ensayo se pueden seleccionar como receptores R1 y R2 aquéllos que se fijan específicamente al antígeno p24 de HIV1. Los R1 y R2 se escogen en este caso de tal manera que reconozcan y se fijan tanto al p24 de HIV1 como también al p24 de HIV1-SubO. En tal caso puede ser necesario utilizar varios diferentes receptores para R1 y R2, a fin de detectar todos los subtipos del grupo M de HIV1 como el subtipo O de HIV1. Adicionalmente, al realizar la detección simultánea de HIV1, HIV2 y HIV1-SubO se emplean ya sea correspondientes receptores R1 y R2 que reaccionan de modo cruzado u otros receptores R1 y R2, que reconocen específicamente también al antígeno p26 de HIV2. El número de los receptores R1 y R2 que se han de utilizar es dependiente de la reactividad cruzada u homología de los epítomos escogidos. Mediante selección favorable es posible reducir el número de los receptores utilizados. Como receptores R3 y R4 se pueden emplear aquéllos que se fijan de una manera específica a anticuerpos contra productos de genes de env de HIV1 y HIV1-SubO. Es especialmente apropiado en este contexto el antígeno gp41 (de HIV o HIV-SubO) o fragmentos o epítomos de éste. Como otros receptores adicionales R3 y R4 se emplean los receptores que reconocen específicamente a anticuerpos contra productos de genes de env de HIV2. Se manifiesta como especialmente apropiado en este caso el antígeno gp36 o fragmentos o epítomos de éste. Como receptores R5 y R6 se pueden seleccionar aquellos receptores que reconocen específicamente a anticuerpos contra productos de genes de gag ó pol de los HIV1 y HIV1-SubO - con excepción de los epítomos de p24, que pueden reaccionar con los receptores R1 ó R2. Adicionalmente, para el reconocimiento de HIV2 se pueden utilizar otros receptores R5 y R6, que se fijan específicamente a anticuerpos contra productos de genes de gag ó pol de HIV2. Se prefieren para todos los receptores R5 y R6 aquéllos que reconocen a anticuerpos contra los productos de genes de pol de HIV1 y HIV1-SubO o respectivamente de HIV2. De los receptores R5 y R6 contra los tres posibles productos de genes de pol, transcriptasa inversa, integrasa y proteasa, se prefieren especialmente los receptores que reconocen a anticuerpos contra la transcriptasa inversa.

Es objeto del invento también el procedimiento antes descrito para la detección de una infección causada por los HIV, siendo empleados los receptores R1 y R2 en cada caso como receptores individuales o en forma de mezclas de diferentes receptores. En el caso de la utilización de mezclas, los receptores reconocen de modo preferido a diferentes epítomos de p24 ó p26 respectivamente.

El empleo de las mezclas de receptores sirve para garantizar con una única composición de sistema de ensayo el reconocimiento de diferentes subtipos de HIV - en el caso del antígeno p24, el reconocimiento de subtipos del grupo M de HIV1 y HIV1-SubO -.

ES 2 187 947 T3

Conforme al invento, con el procedimiento de detección se pueden detectar también infecciones causadas con el subtipo O de HIV1.

5 Además, con el procedimiento de detección se pueden detectar conforme al invento también con los subtipos del grupo M de HIV1.

Conforme al invento, se pueden emplear por lo tanto también los receptores R3, R4, R5 y R6 en cada caso en forma de mezclas de diferentes receptores, con el fin de garantizar que se reconozcan de manera
10 segura en una tanda de ensayo muestras positivas para HIV1, HIV1-SubO y HIV2. Sin embargo, debe estar garantizado siempre que los diferentes receptores no se obstaculicen recíprocamente de modo esencial en su fijación en torno al antígeno que se ha de detectar, o a los anticuerpos que se han de detectar. De modo preferido, se emplean como receptores R3 y R4 los que presentan en cada caso el mismo epítipo. Con ello se garantiza que las partes, que se fijan a antígenos, del anticuerpo que se ha de detectar, puen-
15 teen a los dos receptores R3 y R4. Dependiendo de los requisitos, se pueden utilizar sin embargo también combinaciones de diferentes epítipos. Por ejemplo, como R3 se podría emplear un gp41 recombinante y como R4 se podrían emplear péptidos, que se derivan del gp41, o polihaptenos - tal como se describen en el documento WO 96/03652 -. Lo mismo es válido para los receptores R5 y R6. Dependiendo de los requisitos, se pueden utilizar combinaciones de diferentes epítipos. Sin embargo también se emplean en
20 ese caso de modo preferido aquéllos receptores que constituyen los mismos epítipos.

El procedimiento conforme al invento se lleva a cabo por lo general como ensayo en húmedo. Junto con los denominados ensayos en húmedo, en los que los reactivos de ensayo se presentan en fase líquida, se pueden utilizar también todos los formatos corrientes de sistemas de ensayo en seco, que sean apropiados
25 para la detección de proteínas o anticuerpos respectivamente. En los casos de todos estos sistemas de ensayo en seco o de tiras de ensayo, como se describen por ejemplo en el documento EP-A-0.186.799, todos los componentes del sistema de ensayo están aplicados sobre un soporte.

En el caso del procedimiento conforme al invento, que se lleva a cabo de modo preferente como ensayo
30 inmunológico heterogéneo, la detección de los antígenos por los receptores R1 y R2 se efectúa de acuerdo con el principio de emparedado (*Sandwich*). El antígeno que se ha de detectar (aquí: p24 ó p26) es fijado por los R1 y R2 en forma de un emparedado por dos lados. La fijación de los anticuerpos por los receptores R3, R4, R5 y R6 se efectúa de acuerdo con el principio del sistema de ensayo de puente. El anticuerpo que se ha de detectar puentea a los receptores R3 y R4 uno con otro. Lo mismo es válido para
35 los receptores R5 y R6. Ambas realizaciones de sistemas de ensayo, el sistema de ensayo en emparedado y el sistema de ensayo de puente, se pueden llevar a cabo simultáneamente en la misma tanda, sin que los dos principios se perturben recíprocamente. Por lo tanto, también es posible incubar todos los receptores conjuntamente con la muestra y llevar a cabo el procedimiento en unas pocas etapas. Solamente antes de la reacción de detección es ventajosa una operación de lavado para la separación de los receptores
40 y constituyentes de la muestra que no se hayan fijado, pero no es indispensablemente necesaria. Los receptores R1, R3 y R5 que son capaces de fijarse a la fase sólida, pueden presentarse en una fase líquida o ya fijados a la fase sólida. De modo preferido, se incuban conjuntamente todos los receptores R1 hasta R6. En tal caso, la fase sólida, a la que se pueden fijar R1, R3 y R5, puede ya estar presente o puede ser añadida tan sólo posteriormente o se puede alcanzar tan sólo posteriormente por difusión o transferencia.

45 Al realizar la incubación se forman el emparedado entre fase sólida•R1•p24(p26)•R2, el puente entre fase sólida•R3•anticuerpo anti-env de HIV•R4 y el puente entre fase sólida•R5•anticuerpo anti-gag/pol de HIV•R6. A continuación, en el caso del ensayo inmunológico heterogéneo se separa la fase sólida con respecto de la fase líquida, eventualmente se lava la fase sólida y se determina la marcación de los R2,
50 R4 y R6. La marcación se mide en la mayor parte de los casos junto a la fase sólida, pero se puede determinar también en la fase líquida.

Si uno o varios de los receptores R1, R3 y R5 ya se presenta(n) en la forma fijada a la fase sólida, la muestra y los correspondientes receptores, es decir R2, R4 y R6, se añaden a los receptores R1, R3
55 y R5 fijados a la fase sólida y se incuban en común. Sin embargo, también es posible reunir la muestra primeramente con los receptores R1, R3 y R5 en la presencia o ausencia de la fase sólida, y añadir los receptores R2, R4 y R6 tan sólo en una etapa subsiguiente.

Es asimismo un objeto del invento un procedimiento para la detección de anticuerpos contra HIV
60 mediante un ensayo inmunológico, que está caracterizado porque se emplean los receptores R3, R4, R5 y R6. Los receptores R1 y R2 no pasan a emplearse en el caso de esta detección pura de anticuerpos. Como receptores R3 y R4 se utilizan, igual que en el sistema combinado de ensayo antes descrito, uno

o varios antígenos procedentes de la región env de HIV1, HIV2 ó HIV1-SubO (gp160, gp120, gp41 para HIV1/HIV1-SubO y gp140, gp110, gp36 para HIV2). Preferiblemente, como receptores R3 y R4 se utilizan los gp41 y/o gp36 o fragmentos de éstos. Como receptores R5 y R6 se utilizan, igual que en el sistema combinado de ensayo antes descrito, uno o varios antígenos procedentes de la región pol o gag de HIV1, HIV2 o HIV1-SubO. De modo preferido, como R5 y R6 se emplean antígenos procedentes de la región pol de HIV1, HIV2 o HIV1-SubO. De modo especialmente preferido, como receptores R5 y R6 se utiliza la transcriptasa inversa (RT).

La realización de la detección de anticuerpos, los formatos de sistemas de ensayo así como las propiedades de los receptores utilizados, son análogos/as al sistema combinado de ensayo, por lo que no se reseñan aquí de un modo especial. Las explicaciones dadas a continuación acerca de los receptores R1 y R2 son válidas para la detección combinada antes descrita (sistema combinado de ensayo) de anticuerpos de HIV y de antígenos de HIV. Las explicaciones dadas acerca de los receptores R3, R4, R5 y R6 son válidas tanto para el sistema combinado de ensayo como también para el procedimiento para la detección de anticuerpos de HIV.

Un constituyente esencial del receptor R1 es un anticuerpo que se fija específicamente al antígeno p24 de HIV1 y eventualmente de HIV1-SubO o al antígeno p26 de HIV2. Se pueden utilizar anticuerpos de todas las subclases, que son capaces de fijarse específicamente con el p24 o con el p26. En lugar de los anticuerpos completos, se pueden utilizar evidentemente también sus fragmentos, tales como los fragmentos Fab, Fab' o F(ab')₂. Los anticuerpos pueden ser policlonales, siempre y cuando que no muestren ninguna reactividad cruzada con los demás constituyentes del ensayo. Puesto que han de plantearse exigentes requisitos en cuanto a la especificidad de los anticuerpos anti-p25 y anti-p26 respectivamente en lo referente al reconocimiento de subtipos de HIV, se emplean sin embargo de modo preferido anticuerpos monoclonales. Son objeto del invento, por lo tanto, también anticuerpos monoclonales contra el antígeno p24. Las propiedades de estos anticuerpos se explican con mayor detalle en un párrafo posterior.

O bien el R1 puede estar fijado directamente a la fase sólida, o la fijación a la fase sólida se efectúa indirectamente a través de un sistema específico de fijación. La fijación directa de R1 a la fase sólida se efectúa de acuerdo con métodos conocidos por un experto en la especialidad. Si la fijación se lleva a cabo indirectamente a través de un sistema específico de fijación, entonces R1 es un conjugado, que consta de un anticuerpo contra el p24 o contra el p26 y de un partícipe en la reacción de un sistema específico de fijación. Por un sistema específico de fijación se entienden aquí dos partícipes, que pueden reaccionar específicamente uno con otro. La capacidad de fijación puede deberse en tal caso a una reacción inmunológica o a otra reacción específica distinta. De modo preferido, como sistema específico de fijación se utiliza una combinación de biotina y avidina o de biotina y estreptavidina. Otras combinaciones preferidas son las de biotina y anti-biotina, de un hapteno y un anti-hapteno, de un fragmento Fc de un anticuerpo y anticuerpos contra este fragmento Fc o de un hidrato de carbono y una lectina. Uno de los partícipes en la reacción de este par capaz de fijarse específicamente, es entonces parte del conjugado, que se fija al receptor R1.

El otro partícipe en la reacción del sistema específico de fijación para R1 se presenta como revestimiento de la fase sólida. La fijación del otro partícipe en la reacción del sistema específico de fijación a un material de soporte insoluble se puede llevar a cabo de acuerdo con los métodos usuales, conocidos por un experto en la especialidad. En este caso se adecua una fijación tanto covalente como también por adsorción. Como fase sólida son apropiados tubitos de reactivos o placas de microtitulación a base de un poliestireno o de materiales sintéticos similares, que en la superficie interna están revestidos con un partícipe en la reacción del sistema específico de fijación. Son además apropiadas y especialmente preferidas sustancias en forma de partículas, tales como por ejemplo partículas de látex, partículas magnéticas, materiales de tamices moleculares, pequeños cuerpos de vidrio, mangueras de materiales sintéticos y similares. Se pueden utilizar como soportes también soportes estratificados porosos tales como papel. De modo especialmente preferido se emplean bolitas magnéticas (las denominadas perlas), que a su vez están revestidas con el correspondiente partícipe en la fijación del sistema específico de fijación que antes se describe. Estas micropartículas se pueden separar entonces de la fase líquida, después de haber transcurrido la reacción de ensayo para la realización de la reacción de detección, por ejemplo por filtración, centrifugación o en el caso de las partículas magnéticas mediante un imán.

El receptor R2 consta de un anticuerpo, que se fija específicamente al antígeno p24 de HIV1 y eventualmente de HIV1-SubO o al antígeno p26 de HIV2, y de una marcación. Se pueden utilizar - igual que en el caso del receptor R1 - anticuerpos de todas las subclases, que son capaces de fijarse específicamente con el p24 o con el p26. En vez de los anticuerpos completos se pueden utilizar también en este caso sus fragmentos, tales como los fragmentos Fab, Fab' o F(ab')₂. Los anticuerpos pueden ser policlonales o

monoclonales. De modo preferido, igual a como en el caso de R1 se emplean anticuerpos monoclonales. De modo especialmente preferido, también en el caso de R2 se utilizan los anticuerpos monoclonales conformes al invento contra el antígeno p24, que se describen en un párrafo posterior. Es decisivo que los anticuerpos empleados en los R1 y R2 reconozcan por lo menos a 2 diferentes epítomos del antígeno p24 o del antígeno p26. Ambos receptores R1 y R2 deben de poder fijarse al mismo tiempo de una manera específica con el p24 ó p26, a fin de formar el emparedado. Los epítomos reconocidos por los constituyentes anticuerpos en R1 y R2 deben encontrarse por lo tanto separados en el espacio unos de otros. Esto quiere decir que los epítomos reconocidos por R1 y R2 pueden ciertamente solaparse, pero debe estar garantizado que ambos receptores se puedan fijar al mismo tiempo al epítomo de p24 ó p26 respectivamente. Una condición es siempre el hecho de que los dos receptores no se obstaculicen esencialmente de modo recíproco en su comportamiento de fijación al p24 ó p26 respectivamente.

En el caso del empleo de mezclas de receptores para R1 y R2 también es posible utilizar los mismos receptores tanto para R1 como también para R2. Un determinado número de receptores R1 sería capaz de fijarse entonces con la fase sólida, los restantes receptores R1 no serían capaces de fijarse con la fase sólida y en vez de ello llevarían la marcación. Lo mismo es válido para R2. El emparedado puede formarse tanto en la orientación de fase sólida•R1•p24•R2 como también en la orientación de fase sólida•R1(epítomo de R2)•p24•R2(epítomo de R1).

Otro constituyente del receptor R2 es la marcación. De modo preferido, se emplea como marcación una sustancia detectable directamente, por ejemplo una sustancia quimioluminiscente, electro-quimioluminiscente, fluorescente o radiactiva, o una partícula de sol metálico, látex u oro. Se prefieren adicionalmente como marcación enzimas u otras moléculas tales como haptenos (p.ej. digoxigenina) o colorantes fluorescentes, por ejemplo fluoresceína. Una marcación especialmente preferida la constituyen quelatos metálicos electro-quimioluminiscentes, tal como se describen en el documento WO 96/ 03651. Como quelatos metálicos se emplean de modo preferido complejos con rutenio, que se divulgan asimismo en el documento WO 96/03651. Los procedimientos para la marcación son habituales para un experto en la especialidad y no necesitan aquí ninguna explicación adicional. La detección de la marcación se efectúa, de un modo en sí conocido, directamente por medición de la sustancia quimioluminiscente, fluorescente o radiactiva o de la partícula de sol metálico, látex u oro, o por medición del substrato convertido por la enzima.

La detección de la marcación puede efectuarse también de un modo indirecto. En tal caso, un receptor adicional, que por sí mismo está acoplado a su vez con un grupo generador de señales, se fija específicamente a la marcación de R2, por ejemplo un hapteno tal como digoxigenina. La producción de receptores marcados con haptenos, y en particular marcados con digoxigenina, se describe en el documento WO 96/03423.

La detección del grupo generador de señales, por ejemplo una sustancia electro-quimioluminiscente, fluorescente o radiactiva, o una enzima o partícula de oro, se efectúa de acuerdo con métodos habituales para un experto en la especialidad. Como receptor adicional se puede emplear por ejemplo un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, que se fija específicamente a la marcación de R2. Si se utiliza esta detección indirecta de la marcación, entonces la marcación de R2 es preferiblemente digoxigenina u otro hapteno, y la detección se efectúa a través de un anticuerpo, que está dirigido contra digoxigenina o contra el hapteno y está marcado con una peroxidasa u otra marcación distinta, tal como antes se describe.

De modo preferido, como constituyentes de los receptores R1 y R2 se emplean anticuerpos monoclonales o sus fragmentos. Son objeto del presente invento, por lo tanto, también anticuerpos monoclonales, que se fijan específicamente al antígeno p24 de HIV1 con una afinidad suficientemente alta para la formación de un emparedado. Los anticuerpos monoclonales se pueden utilizar de este modo en todos los sistemas de ensayo habituales para un experto en la especialidad para la detección de una proteína tal como por ejemplo en el sistema de ensayo en emparedado.

Los anticuerpos monoclonales conformes al invento pueden pertenecer a todas las posibles clases de inmunoglobulinas (Ig). De modo preferido, los anticuerpos monoclonales pertenecen a la clase de IgG1. El acoplamiento de otros componentes, tales como por ejemplo marcaciones, tales como enzimas o haptenos o participantes en la fijación, que se necesitan para la fijación del anticuerpo a una fase sólida en el caso de ensayos inmunológicos heterogéneos, se puede efectuar de modo preferido con anticuerpos IgG1. También carece de problemas la producción de fragmentos de anticuerpos, tales como por ejemplo los fragmentos F(ab')₂, Fab' o Fab en el caso de la clase de IgG1.

Conforme al invento, por la denominación de "anticuerpos monoclonales" se entienden tanto el anti-

cuerpo completo como también todos los fragmentos de éste, que son corrientes en ensayos inmunológicos y otras utilizaciones, tales como los fragmentos F(ab')₂, Fab' o Fab. Son abarcados también los anticuerpos que se habían producido por modificación de los anticuerpos monoclonales, siempre y cuando que no se influya decisivamente sobre la propiedad de fijación a antígenos. Por ejemplo, mediante medidas de tecnología genética, ciertas partes de anticuerpos monoclonales producidos normalmente en ratones se pueden reemplazar por correspondientes secuencias de anticuerpos humanos, a fin de minimizar las fijaciones inespecíficas en el ensayo inmunológico. Procedimientos para la producción de tales anticuerpos monoclonales quiméricos son conocidos por un experto en la especialidad por ejemplo a partir de las citas Antibody Engineering [Ingeniería de anticuerpos], J. Mc Cafferty, H.R. Hooggenboom y D.J. Chiswell, de Practical Approach Series, coordinador de edición de la serie: B.D. Hames, Oxford University Press, 1996.

Son decisivos para la idoneidad de los anticuerpos los epítomos del p24, que son reconocidos por los anticuerpos, puesto que éstos son decisivos para el reconocimiento de todos los subtipos. Para los epítomos del p24 se tomó como fundamento la información estructural procedente de la cita de Gitti y colaboradores (Science 1996, volumen 273, páginas 231-235). Son conformes al invento, por consiguiente, también anticuerpos producidos de una manera distinta, que reconocen a los mismos epítomos que los anticuerpos descritos a continuación o los epítomos que se solapan con aquellos. Los epítomos pueden ser caracterizados por ejemplo por el método de Pepsan. En el Ejemplo 4 de la presente solicitud se describe el modo de proceder exacto en el cartografiado de epítomos de los anticuerpos conformes al invento. Se prefiere la región de epítomos de p24, a la que se fijan los anticuerpos conformes al invento, seleccionada entre el grupo de las siguientes secuencias de aminoácidos. Estas secuencias se indican también en el protocolo de secuencias como SEQ ID NO 1-36.

25

	Secuencia	Péptido	SEQ ID NO
	DKGNSSQVSNYP I VQNLQGQMVHQ	1	1
30	NYP I VQNLQGQMVHQ A I S P R T L N A W	2	2
	Q M V H Q A I S P R T L N A W V K V I E E K A F S	3	3
35	TLNAWVKVIEEKAFSPEVIPMFSAL	4	4
	EKA FSPEVIPMFSALSEGATPQDLN	5	5
40	MFSALSEGATPQDLN TMLNTVGGHQ	6	6
	PQDLN TMLNTVGGHQ A A M Q M L K E T I	7	7
	VGGHQ A A M Q M L K E T I N E E A A E W D R V	8	8
45	L K E T I N E E A A E W D R V H P V H A G P I A P	9	9
	E W D R V H P V H A G P I A P G Q M R E P R G S D	10	10
50	G P I A P G Q M R E P R G S D I A G T T S T L Q E	11	11
	P R G S D I A G T T S T L Q E Q I G W M T N N P P	12	12
	S T L Q E Q I G W M T N N P P I P V G E I Y K R W	13	13
55	T N N P P I P V G E I Y K R W I I L G L N K I V R	14	14
	I Y K R W I I L G L N K I V R M Y S P V S I L D I	15	15
60	N K I V R M Y S P V S I L D I R Q G P K E P F R D	16	16
	S I L D I R Q G P K E P F R D Y V D R F Y K T L R	17	17

	EPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKN	18	18
5	YKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQN	19	19
	QEVKNWMTETLLVQNaNPDCKTILK	20	20
10	LLVQNaNPDCKTILKALGPAATLEE	21	21
	KTILKALGPAATLEEMMTACQGVGG	22	22
	ATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAE	23	23
15	QGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSAT	24	24
	RVLAEAMSQVTNSATIMMQRGNFRN	25	25
20	TNSATIMMQRGNFRNQKKTIVKCFNC	26	26
	GNFRNQKKTIVKCFNCGKEGHIKNC	27	27
	KCFNCGKEGHIKNCRAPRLKGCWK	28	28
25	IAKNCRAPRLKGCWKCGKEGHQMKD	29	29
	KGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKI	30	30
30	QAISPRTLNAWVKVI	3A	31
	ISPRTLNAWVK	3B	32
35	INEEAAEWDRVHPVH	9A	33
	EEAAEWDRVHP	9B	34
	IRQGFKEPFRDYVDR	17A	35
40	QGFKEPFRDYV	17B	36

Son objeto del invento también anticuerpos monoclonales contra el antígeno p24 de HIV1, que se fijan específicamente a los epítomos de p24 según SEQ ID NO: 1-36.

45 Son además objeto del invento anticuerpos monoclonales contra el antígeno p24 de HIV1, que se fijan específicamente a los epítomos de p24 según SEQ ID NO: 3, 9, 17, 31 ó 34. Estas secuencias se resaltan en letra negrita en la exposición anterior.

50 Además son objeto del invento los epítomos de p24 según SEQ ID NO: 3, 9, 17, 31 ó 34.

Los anticuerpos monoclonales conformes al invento se pueden producir por ejemplo a partir de los linajes celulares MAK<p24>M-6A9/5, MAK<p24>M-4B1/1, MAK<p24>M-6D9/4, MAK<p24>M-2E7/3 ó MAK<p24>M6A9/5. Los anticuerpos monoclonales MAK<p24>M-4B1/1 (número de depósito en DSM ACC2299), MAK<p24>M-6D9/4 (número de depósito en DSM ACC2300) y MAK<p24>M-2E7/3 (número de depósito DSM ACC22301), se depositaron el 26.02.1997 en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares S.A.], Mascheroder Weg 1b, D-38124, Braunschweig). El anticuerpo monoclonal MAK<p24>M6A9/5 se presentó el 11.06.1997 en la DSMZ bajo el número de depósito DSM ACC2310.

60 Con el procedimiento de cartografiado de epítomos que se describe en el Ejemplo 4 se comprobó que los anticuerpos, que son producidos por el linaje celular MAK<p24>M-6A9/5, no reconocen a ningún epítomo secuencial, sino a un epítomo de conformación del p24.

Con el mismo procedimiento, se comprobó que los anticuerpos, que son producidos por el linaje celular MAK<p24>M-2E7/3 (DSM ACC2301), se fijan al epítipo que corresponde a un péptido según SEQ ID NO: 9 (información estructural acerca del p24 de acuerdo con Gitti y colaboradores, 1996, Science, 273, 231-235). Se pudo mostrar además que el epítipo propiamente dicho es todavía de menor tamaño. Para la fijación específica del MAK<p24>M-2E7/3 al p24 es suficiente un epítipo que abarca solamente 11 aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 34.

Con el mismo procedimiento, se comprobó que los anticuerpos, que son producidos por el linaje celular MAK<p24>M-6D9/4 (DSM ACC2300), se fijan al epítipo que corresponde a un péptido de acuerdo con SEQ ID NO: 3. Además, se pudo mostrar que el epítipo necesario para la fijación específica es todavía de menor tamaño: Para la fijación específica del MAK<p24>M-6D9/4 al p24 es suficiente un epítipo que abarca 15 aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 31.

Con el mismo procedimiento, se comprobó que los anticuerpos, que son producidos por el linaje celular MAK<p24>M-4B1/1 (DSM ACC2299), se fijan al epítipo que corresponde a un péptido de acuerdo con SEQ ID NO: 17.

Los anticuerpos producidos por los linajes celulares MAK<p24>M-4B1/1 y MAK<p24>M-6D9/4 fijan a los epítipos de p24, aquí caracterizados con anterioridad, no solamente de HIV1 sino también de HIV1-SubO. Para el reconocimiento simultáneo del antígeno p24 de HIV1 y del subtipo O de HIV1 son apropiados por lo tanto especialmente los anticuerpos producidos por estos linajes celulares. En el Ejemplo 5 se reproduce la realización del ensayo de los anticuerpos conformes al invento en lo que se refiere al reconocimiento de los subtipos de p24. De los dos anticuerpos, el MAK<p24>M-4B1/1 se utiliza de modo preferido por el lado de la fase sólida, es decir como receptor R1, y el MAK<p24>M-6D9/4 se utiliza de modo preferido como receptor R2.

De modo especialmente preferido, para un reconocimiento simultáneo efectivo de HIV1 y HIV1-SubO se emplean los anticuerpos MAK<p24>4B1/1 y MAK<p24>6A9 como R1 y los MAK<p24>E7/3 y MAK<p24>6D9/4 como R2, puesto que de esta manera se consigue el reconocimiento más amplio de diferentes materiales aislados de virus de HIV1 y de HIV1 del subtipo O (véase el Ejemplo 5).

Son objeto del invento, además, anticuerpos, de modo preferido anticuerpos monoclonales (MAK de *Monoklonale AntiKörper*), que se fijan al p24 de una manera equivalente a como lo hacen los anticuerpos monoclonales MAK<p24>M-6A9/5 (DSM ACC2310), MAK<p24>M-4B1/1 (DSM ACC2299), MAK<p24>M-6D9/4 (DSM ACC2300) ó MAK<p24>M-2E7/3 (DSM ACC2301). Por la expresión "se fijan de una manera equivalente" se entiende que estos anticuerpos se fijan al p24 con una afinidad igualmente alta o comparablemente alta que la de los anticuerpos monoclonales depositados. Esto se puede comprobar por ejemplo mediante correspondientes experimentos en el sistema BIAcore[®] o también con el sistema ELISA en emparejado de dos etapas conforme al Ejemplo 4.

Son objeto del invento, además, anticuerpos, de modo preferido anticuerpos monoclonales, que se fijan al p24 junto a los mismos epítipos, que los anticuerpos depositados MAK<p24>M-6A9/5 (DSM ACC2310), MAK<p24>M-4B1/1 (DSM ACC2299), MAK<p24>M-6D9/4 (DSM ACC2300) ó MAK<p24>M-2E7/3 (DSM ACC2301). Esto se puede comprobar por determinación de la reactividad cruzada de los anticuerpos, por ejemplo mediante experimentos de competición en un ELISA o con el sistema BIAcore[®]. De modo preferido, estos anticuerpos poseen asimismo una alta afinidad para el p24.

Un objeto adicional del invento es la utilización de por lo menos uno de los anticuerpos descritos en los párrafos anteriores, en un ensayo de diagnóstico para la detección de una infección causada por los HIV. Es asimismo objeto del invento la utilización de los anticuerpos descritos en el sistema combinado de ensayo conforme al invento antes explicado para la detección de una infección causada por los HIV.

Los anticuerpos monoclonales conformes al invento se pueden producir de manera en sí conocida por inmunización con un p24 aislado (aislado a partir de un tejido humano, o recombinante) en apropiados animales experimentales, tales como por ejemplo ratones, ratas, conejos, y subsiguiente fusión de las células de bazo de los animales inmunizados con células de mieloma. Junto a células de bazo como fuente de linfocitos se pueden utilizar también linfocitos de sangre periférica (PBL de Periphäre Blut-Lymphocyten) o células de nudos linfáticos de animales inmunizados (de modo preferido: ratones o ratas). En vez de un p24 aislado se pueden utilizar para la inmunización también péptidos sintéticos, derivados del p24, que son utilizados a solas o acoplados a soportes, para la producción de los anticuerpos deseados.

Alternativamente, también pueden ser inmortalizados linfocitos de donantes humanos, que han desarrollado anticuerpos contra el p24. Tales linfocitos productores de anticuerpos anti-p24 pueden ser inmortalizados ya sea por fusión con un linaje celular de mieloma humano o por transformación de un virus de Epstein-Barr (EBV) para formar células de hibridoma, productoras de anticuerpos (Monoclonal
 5 Antibody and Immunosensor Technology [Tecnología de anticuerpos monoclonales y sensores inmunitarios], A.M. Campbell, editorial Elsevier 1991; Monoklonale Antikörper [Anticuerpos monoclonales], J.H. Peters, H. Baumgarten, editorial Springer 1990; Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications [Técnicas y aplicaciones de la producción de anticuerpos monoclonales], coordinador de edición Lawrence B. Schook, editorial Marcel Dekker 1987).

10 Un constituyente esencial del receptor R3 es un antígeno, que es capaz de fijarse específicamente con los anticuerpos que se han de determinar, que están dirigidos contra un antígeno procedente de las regiones env de HIV1 ó HIV1-SubO y/o HIV2. El antígeno es, de modo preferente, capaz de fijarse con los anticuerpos que están dirigidos contra gp41 ó gp120 (de HIV1) o contra gp36 ó gp110 (de HIV2),
 15 y es especialmente capaz de fijarse con los anticuerpos, que están dirigidos contra gp41 ó gp36. Por el concepto de “antígeno” ha de entenderse una molécula que es capaz de una fijación específica con un anticuerpo dirigido contra un producto de genes de env de HIV. El antígeno puede corresponder en tal caso al antígeno natural. Por lo tanto, puede haber sido aislado a partir del virus o producido por una recombinación. Se pueden emplear también péptidos sintéticos o preparados por una recombinación, que
 20 están en situación de fijarse específicamente con el anticuerpo que se ha de determinar. El antígeno puede haber sido derivatizado también por medio de otros ligandos, tales como por ejemplo lípidos o azúcares. También son posibles intercambios de aminoácidos (D- y L-aminoácidos o moléculas afines) o bien delecciones o inserciones de aminoácidos. Otras modificaciones del antígeno, que son ventajosas para la realización de los ensayos, tales como p.ej. mediante la producción de polihaptenos como se describe en el documento WO 96/03652, pueden haber sido encontradas fácilmente por un experto en la especialidad.
 25 La única premisa consiste en que los anticuerpos que se han de determinar han de poder fijarse todavía específicamente con el antígeno modificado, a pesar de las modificaciones. Esto quiere decir que el sitio de fijación para el (o los) anticuerpo(s) debe conservarse en el antígeno, que es parte constituyente de R3.

30 O bien el R3 puede estar fijado directamente a la fase sólida, o la fijación a la fase sólida se efectúa indirectamente a través de un sistema específico de fijación. Las fijaciones directa e indirecta de R3 a la fase sólida se efectúan de manera análoga al modo que se ha descrito para el receptor R1.

35 El receptor R4 consta de un antígeno, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno de las regiones env de HIV1 o HIV1-SubO y/o HIV2, y de una marcación. El antígeno es, de modo preferido, capaz de fijarse con un anticuerpo que está dirigido contra gp41 ó gp120 o bien gp36 ó gp110 respectivamente, de modo especialmente preferido es capaz de fijarse con un anticuerpo que está dirigido contra gp41 y gp36 respectivamente. Las condiciones para el antígeno, así como la definición del concepto, son idénticas a las condiciones mencionadas para el receptor R3. De modo preferido, como “componentes de antígenos” de los receptores R3 y R4 se emplean los mismos antígenos. Sin embargo, también es posible emplear diferentes antígenos. Sin embargo, debe estar garantizado que ambos componentes antígenos de R3 y R4 sean capaces de fijarse con el mismo anticuerpo que se ha de determinar. Siempre constituye premisa que el anticuerpo que se ha de determinar ha de puentear a los dos receptores R3 y R4.
 40

45 Un constituyente adicional del receptor R4 es la marcación. Las premisas para la marcación en R4 son las mismas que las que se han descrito para la marcación del receptor R2. De modo preferido, para R2 y R4 se utilizan las mismas marcaciones.

50 El receptor R5 consta en lo esencial de un antígeno, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno de las regiones pol o gag de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2, realizándose que no se debe tratar de epítomos ni secuencias de un p24 ó p26, que puedan reaccionar con los receptores R1 o R2. El antígeno es de modo preferido capaz de fijarse con un anticuerpo que está dirigido contra productos de genes de la región pol, de modo especialmente preferido capaz de fijarse con un anticuerpo que está dirigido contra la transcriptasa inversa (RT). Es especialmente apropiada en este caso la RT presente por naturaleza, que se presenta en forma de un heterodímero (que consta de las dos subunidades de 51 y 66 kDa) y posee una estructura en lo posible nativa. Las subunidades se pueden utilizar sin embargo también de modo individual. De modo especialmente preferido, se utiliza una RT purificada producida por recombinación, que es expresada por un clon de expresión, tal como se ha descrito por ejemplo en la cita de Müller y colaboradores en J. Biol. Chem. 264/24: 13975-13978 (1989). Por causa del alto grado de homología en el plano de los aminoácidos, que existe entre las RT de HIV1 y HIV2, con una coincidencia de aproximadamente 60 %, o en ciertos tramos
 60

incluso de 100%, de las dos proteínas, la RT de HIV1 es suficiente por lo general para ser reconocida también por anticuerpos de HIV2. Eventualmente, sin embargo también la RT de HIV2 se puede emplear a solas o de modo adicional. En vez de la RT, se puede utilizar también un antígeno, que es capaz de fijarse con un anticuerpo que está dirigido contra productos de genes de la región gag, con excepción de los epítomos de p24 ó p26, que reaccionan con los receptores R1 ó R2. De modo preferido, el antígeno es capaz de fijarse con un anticuerpo que está dirigido contra gag-p17. Para la definición del concepto de “antígeno” sirven las mismas explicaciones que se han descrito para los receptores R3 y R4, con excepción de la especificidad: El antígeno, en el caso del receptor R5, es naturalmente una molécula que es capaz de fijarse de manera específica con un antígeno dirigido contra un producto de genes de gag ó pol de HIV.

O bien el R5 puede estar fijado directamente a la fase sólida, o la fijación a la fase sólida se efectúa indirectamente a través de un sistema específico de fijación. Las fijaciones directa e indirecta de R5 a la fase sólida se efectúan de una manera análoga al modo que se ha descrito para los receptores R1 y R3.

El receptor R6 consta en lo esencial de un antígeno, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo que se ha determinar, que está dirigido contra un antígeno procedente de las regiones pol ó gag de HIV1, HIV-SubO y/o HIV2. El antígeno es de modo preferido capaz de fijarse con un anticuerpo que está dirigido contra productos de genes de la región pol, de modo especialmente preferido capaz de fijarse con un anticuerpo que está dirigido contra la transcriptasa inversa. Las explicaciones dadas en el párrafo correspondiente al receptor R5, en lo que se refiere a las propiedades preferidas de los antígenos, son válidas también para R6. Acerca de la definición del concepto “antígeno” es válido lo mismo que para el receptor R5. De modo preferido, como “componentes antígenos” de los receptores R5 y R6 se emplean los mismos antígenos. Sin embargo, también es posible emplear antígenos diferentes. Sin embargo, debe estar garantizado que ambos componentes antígenos de R5 y R6 sean capaces de fijarse con el mismo anticuerpo que se ha de determinar. Siempre es premisa que el anticuerpo que se ha de determinar ha de puentear a los dos receptores R5 y R6.

Un constituyente adicional del receptor R6 es la marcación. Las premisas para la marcación en R6 son las mismas que se han descrito para la marcación de los receptores R2 y R4. De modo preferido, para R2, R4 y R6 se utilizan las mismas marcaciones.

Para todos los antígenos, que se utilizan como receptores R3, R4, R5 ó R6, es válido que ellos se pueden emplear individualmente o de modo preferido también reticulados como oligómeros o como polihaptenos (moléculas de soporte o partículas de soporte cargadas con los antígenos) de acuerdo con el documento WO 96/03652. Con ello se mejora el reconocimiento de un IgM.

Como muestras, que se emplean en el procedimiento de detección, se pueden utilizar todos los líquidos biológicos conocidos por un experto en la especialidad. De modo preferido, como muestras se emplean líquidos corporales tales como sangre entera, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina, saliva, etc.

En las tandas de ensayo, junto a la muestra, la fase sólida y los receptores reseñados pueden estar presentes otros aditivos, que se necesiten dependiendo de la utilización, tales como tampones, sales, detergentes, aditivos proteínicos tales como por ejemplo RSA (de *Rinder Serum Albumin = albúmina de suero bovino*) y productos de desdoblamiento de proteínas, tal como por ejemplo una peptona. Los aditivos necesarios son conocidos por un experto en la especialidad o pueden ser encontrados por éste de una manera sencilla.

Un objeto adicional del invento es un estuche de reactivos para la detección de un infección causada por los HIV, que contiene por lo menos un receptor R1, que es capaz de fijarse específicamente con el antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o con el antígeno p26 de HIV2, y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida, por lo menos un receptor R2, que es capaz de fijarse específicamente con el antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o con el antígeno p26 de HIV2 y que lleva una marcación, siendo diferentes los epítomos reconocidos por R1 y R2, por lo menos un receptor R3, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2, y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida, por lo menos un receptor R4, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env, y que lleva una marcación, por lo menos un receptor R5, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2, dirigido contra un antígeno de la región pol ó gag, y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida, por lo menos un receptor R6 que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2, que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región pol ó gag, y que lleva una marcación, así como eventualmente otros materiales auxiliares usuales.

ES 2 187 947 T3

Es además un objeto del invento un estuche de reactivos, que ha sido descrito en lo que antecede, el cual está caracterizado porque como los receptores R1 y R2 se emplean anticuerpos, que son producidos por los linajes celulares MAK<p24>M-6A9/5, MAK<p24>M-4B1/1, MAK<p24>M-6D9/4 y/o MAK<p24>M-2E7/3.

5

Es asimismo un objeto del invento un estuche de reactivos para la detección de anticuerpos contra los HIV, en el que están contenidos los receptores R3, R4, R5 y R6, así como eventualmente otros materiales auxiliares usuales. No están contenidos los receptores R1 y R2.

10

Es también un objeto del invento una tira de ensayo para la detección de una infección causada por los HIV, en la que se han aplicado por lo menos un receptor R1, que es capaz de fijarse específicamente con el antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o con el antígeno p26 de HIV2 y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida, por lo menos un receptor R2, que es capaz de fijarse específicamente con el antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o con el antígeno p26 de HIV2 y que lleva una marcación, siendo diferentes los epítomos reconocidos por R1 y R2, por lo menos un receptor R3, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env, y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida, por lo menos un receptor R4 que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env y que lleva una marcación, por lo menos un receptor R5, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región pol ó gag, y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida, por lo menos un receptor R6 que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región pol ó gag y que lleva una marcación, así como eventualmente otros materiales auxiliares usuales.

15

20

25

Un objeto adicional del invento es una tira de ensayo para la detección de anticuerpos contra los HIV, en el que están contenidos los receptores R3, R4, R5 y R6 así como eventualmente otros materiales auxiliares usuales. No están contenidos los receptores R1 y R2.

30

En las Figuras 1 y 5 se representa lo siguiente:

35

En la Figura 1: La determinación de la meseta (*Plateau*) del anticuerpo monoclonal MAK<p24>M-6A9/5: La determinación de la concentración óptima de MAK empleada para el cartografiado de epítomos se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4.2.

En la Figura 2: La determinación de la meseta (*Plateau*) del anticuerpo monoclonal MAK<p24>M-4B1/1.

40

En la Figura 3: La determinación de la meseta (*Plateau*) del anticuerpo monoclonal MAK<p24>M-6D9/4.

En la Figura 4: La determinación de la meseta (*Plateau*) del anticuerpo monoclonal MAK<p24>M-2E7/3.

45

En la Figura 5: El cartografiado de epítomos de p24; Reacción de los <p24>MAK's con diferentes mezclas de péptidos según el Ejemplo 4.2.3.

Los siguientes Ejemplos explican adicionalmente el invento.

50

Ejemplos

Ejemplo 1

55

Realización del sistema combinado de ensayo

60

La realización del sistema de ensayo se efectúa de una manera análoga al modo de proceder que se describe en el folleto anejo al envase del sistema de ensayo Enzymun Test[®] Anti-HIV1+2+Subtipo O (número de encargo 1557319, Boehringer Mannheim GmbH, Alemania). Exceptuando a los receptores R1 hasta R6, se emplean los reactivos y los tampones del sistema Enzymun Test[®] anti-HIV1+2+Subtipo O de la entidad Boehringer Mannheim GmbH. El sistema de ensayo se realiza en el aparato ES700 (fabricante: Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) en un volumen de muestras de 100 µl dentro de

ES 2 187 947 T3

tubitos de ensayo revestidos con estreptavidina, de acuerdo con el principio del ELISA en emparejado en 2 etapas. En particular se utilizan los siguientes reactivos:

- Tampón de incubación: Tris 25 mM de pH 7,5; constituyentes de suero bovino
- Tampón de conjugado: Tris 25 mM de pH 7,5; constituyentes de suero bovino
- Conjugado: Anticuerpo anti-digoxigenina de cordero marcado con peroxidasa (POD)
- Substrato: Solución del substrato ABTS[®] (2,2'-azino-di[3-etil-benzotiazolina-sulfonato] 1,9 mmol/l en un tampón de fosfato y citrato de 100 mmol/l, de pH 4,4, perborato de sodio 3,2 mmol/l

Como receptores R1 hasta R6 se emplean (Bi es la abreviatura de biotina, Dig es la abreviatura de digoxigenina):

- R1: MAK<p24>M-6A9/5-IgG-Bi, MAK<p24>M-4B1/1-IgG-Bi
- R2: MAK<p24>M-6D9/4-IgG-Dig, MAK<p24>M-2E7/3-IgG-Dig
- R3: (péptidos gp36, gp41)-Bi y polihaptenos-Bi correspondientes a los péptidos utilizados en el sistema de ensayo Enzymun Test[®] Anti-HIV1+2+SubO, número de encargo 1557319, Boehringer Mannheim, Alemania
- R4: (péptidos gp36-, gp41)-Dig y polihaptenos-Dig correspondientes a los péptidos utilizados en el sistema de ensayo Enzymun Test[®] Anti-HIV1+2+SubO, número de encargo 1557319, Boehringer Mannheim, Alemania
- R5: RT-Bi producida a partir de RT, número de encargo 1465333, Boehringer Mannheim, Alemania
- R6: RT-Dig producida a partir de RT, número de encargo 1465333, Boehringer Mannheim, Alemania.

Las derivatizaciones con derivados de biotina y digoxigenina activados, que son necesarias para ello, se llevaron a cabo de acuerdo con procedimientos conocidos por un experto en la especialidad a partir de los libros de texto. Para la derivatización de las RT o de los anticuerpos se adecuan de modo preferido las D-biotina- ϵ -amino-hexanoil-N-hidroxi-succinimida y D-digoxigenina-3-carboximetil-éter- ϵ -amino-hexanoil-N-hidroxi-succinimida.

Los receptores R1 hasta R6 (anticuerpos, polihaptenos y RT, en cada caso 50-300 ng/ml, péptidos 5-50 ng/ml) se añaden conjuntamente con el tampón de incubación en los tubitos revestidos con estreptavidina y se incuban durante 120 min. Después de varios procesos de lavado y de una incubación durante 60 minutos con el conjugado, se añade la solución de substrato y se determinan fotométricamente los valores de extinción de las soluciones cromáticas resultantes después de 60 min a 422 nm.

Ejemplo 2

Comparación de diferentes sistemas combinados de ensayo

Con el fin de comparar el invento con el estado de la técnica, se midieron grupos de trabajo (paneles) de seroconversión de HIV comerciales de la entidad Boston Biomedica Inc., Bridgewater, EE.UU. (BBI) y se compararon con los datos suministrados por la BBI (Tabla 1):

Panel N de BBI: Número de encargo PRB914

Panel W de BBI: Número de encargo PRB923

Panel AG de BBI: Número de encargo PRB932

Ensayo de HIV-Ag: Ag (antígeno) monoclonal de HIV de Abbott, número de producto 2A81 (datos de BBI)

Ensayo 1 de anti-HIV: HIV1/2 de Abbott, número de producto 3A77 (datos de BBI)

Ensayo 2 de anti-HIV: Gen.Sys. HIV1/2, número de producto 0230 (datos de BBI)

Kombitest 1: Anticuerpos anti-p24, gp41 y gp36 (véase la descripción más adelante)

ES 2 187 947 T3

Kombitest 2: Anticuerpos anti-p24 y RT (véase la descripción más adelante)

Kombitest 3: Anticuerpos anti-p24, gp41, gp36 y RT (véase la descripción más adelante)

5 Los tres sistemas de ensayo combinados (Kombitests) se realizaron en condiciones idénticas con los mismos reactivos, con excepción de los diferentes antígenos. La realización de los ensayos se efectuó de manera análoga al Ejemplo 1. Como base sirvieron (igual que en el Ejemplo 1) los reactivos y la aplicación a 25°C del producto comercial Enzygum Test[®] Anti-HIV-1+2+subtipo O (número de encargo 1557319, Boehringer Mannheim, Alemania). Para los Kombitests 1 a 3 se utilizaron los siguientes anticuerpos y
10 respectivamente antígenos:

- Kombitest 1:

15 MAK<p24>M-6A9/5-IgG-Bi, MAK<p24>M-4B1/1-IgG-Bi y péptidos y polihaptenos sintéticos (gp41 y gp36) biotinilados procedentes del sistema Enzygum Test[®] Anti-HIV1+1+2+Subtipo O, MAK<p24>M-6D9/4-IgG-Dig, MAK<p24>M-2E7/3-IgG-Dig y péptidos y polihaptenos sintéticos (gp41 y gp36) digoxigenilados, procedentes del sistema Enzygum Test[®] Anti-HIV1+1+2+Subtipo O

- Kombitest 2:

20 MAK<p24>M-6A9/5-IgG-Bi, MAK<p24>M-4B1/1-IgG-Bi y transcriptasa inversa recombinante de HIV biotinilada

MAK<p24>M-6D9/4-IgG-Dig, MAK<p24>M-2E7/3-IgG-Dig y transcriptasa inversa recombinante de HIV digoxigenilada

- Kombitest 3 (conforme al invento):

25 R1: MAK<p24>M-6A9/5-IgG-Bi, MAK<p24>M-4B1/1-IgG-Bi.

R3: Péptidos y polihaptenos sintéticos (gp41 y gp36) biotinilados, procedentes del sistema Enzygum Test[®] Anti-HIV1+1+2+Subtipo O

30 R5: Transcriptasa inversa recombinante de HIV biotinilada

R2: MAK<p24>M-6D9/4-IgG-Dig, MAK<p24>M-2E7/3-IgG-Dig.

R4: Péptidos y polihaptenos sintéticos (gp41 y gp36) digoxigenilados, procedentes del sistema Enzygum Test[®] anti-HIV1+1+2+Subtipo O

35 R6: Transcriptasa inversa recombinante de HIV digoxigenilada.

Para todos los ensayos se indica la relación de la señal al valor de corte (índice de corte, coi, de *Cut-off Index*). Los datos han de interpretarse de la siguiente manera: los valores menores que 0,9 son
40 negativos. Los valores situados entre 0,9 y 1,0 están en la zona en gris y los valores mayores o iguales que 1,0 son positivos. En la columna “día” se registra el número de días que han transcurrido desde la primera extracción de sangre señalada. Los paneles empleados contienen diferentes analitos (antígenos y anticuerpos), que aparecen en la fase de seroconversión después de los tiempos indicados por debajo de “día”.
45

45

50

55

60

ES 2 187 947 T3

TABLA 1

Comparación de diferentes sistemas de ensayo para la detección de HIV

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Panel	Día	Ensayo de HIV-Ag	Ensayo 1 de anti-HIV	Ensayo 2 de anti-HIV	Kombitest 1	Kombitest 2	Kombitest 3
Panel N de BBI	0	0,4	8,4	0,8	8,9	0,4	11,3
	4	0,5	7,8	1,1	5,7	0,1	7,4
	7	0,5	8,0	1,4	3,5	0,1	4,5
	25	0,4	12,8	2,8	1,4	0,8	3,3
	31	0,4	11,4	3,0	1,1	2,3	4,3
Panel W de BBI	0	0,4	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3
	7	0,4	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3
	12	0,5	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3
	14	0,4	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3
	28	0,4	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3
	30	0,4	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3
	35	0,4	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3
	37	1,0	0,1	0,2	0,4	0,2	0,4
	47	23,3	1,4	0,2	8,4	10,9	14,3
	84	0,4	7,8	5,5	1,2	24,3	16,6
	86	0,4	7,6	5,5	1,2	24,3	16,1
	145	0,4	17,2	4,0	6,5	24,3	24,8
	161	0,5	17,2	3,1	6,4	24,3	24,8
Panel AG de BBI	0	0,4	0,1	0,1	0,3	0,2	0,3
	3	0,4	0,1	0,1	0,3	0,5	0,3
	13	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3
	27	4,6	1,1	0,2	1,1	1,0	1,1
	34	6,1	12,5	2,6	10,0	9,2	21,9
	50	1,9	1,7	3,4	4,7	24,2	14,4
	78	3,2	0,6	1,3	2,3	24,3	12,7
	163	1,8	2,1	0,9	0,8	17,3	7,6
	194	1,0	8,6	0,8	0,8	13,1	6,4

Se pone de manifiesto que el sistema combinado de ensayo conforme al invento (Kombitest 3) detecta sin omisiones todas las fases de la infección, a diferencia de los sistemas de ensayo comparativos.

60

ES 2 187 947 T3

Ejemplo 3

Reconocimiento de materiales aislados de virus de HIV1 de diferentes subtipos

5 Mediante la utilización de los cuatro anticuerpos conformes al invento se garantiza un amplio reconocimiento de los subtipos de HIV1. La realización del sistema de ensayo, la composición de los reactivos y la evaluación son idénticas a las del sistema Kombitest 3 conforme al invento del Ejemplo 2. Como muestras, se diluyeron en el suero humano a 1:100 todos los materiales aislados de virus HIV1 señalados (grupo M y subtipo O), puesto que todos los materiales aislados sin diluir proporcionaron la señal máxima
10 de igual magnitud y por consiguiente no podían observarse diferencias algunas.

TABLA 2

15

Virus de HIV1	Subtipo	Índice de corte
MP20	Subtipo A	9,0
MP33	Subtipo A	22,2
MP95	Subtipo A	19,2
MP97	Subtipo A	9,1
MP157	Subtipo A	36,0
MP8	Subtipo B	23,4
MP13	Subtipo B	18,7
MP22	Subtipo B	22,5
MP51	Subtipo B	20,9
MP77	Subtipo B	30,5
MP37	Subtipo C	9,1
MP40	Subtipo C	22,2
MP41	Subtipo C	9,1
MP76	Subtipo C	18,2
MP148	Subtipo C	16,4
VI693	Subtipo D	16,9
VI722	Subtipo D	10,5
VI824	Subtipo D	16,3
VI979	Subtipo D	23,2
VI1091	Subtipo D	14,9
VI1249	Subtipo E	23,4
MP38	Subtipo E	19,4
MP48	Subtipo E	21,0
MP121	Subtipo E	22,6
MP126	Subtipo E	2,5

60

5
10
15
20

Virus de HIV1	Subtipo	Índice de corte
VI850	Subtipo F	11,0
VI1961	Subtipo F	22,3
VI1126	Subtipo F	11,4
VI1267	Subtipo F	15,3
VI310	Subtipo F	21,4
MP84	Subtipo F	12,2
VI1197	Subtipo G	29,9
VI991	Subtipo H	8,1
VI997	Subtipo H	10,0
MP331	Subtipo O	4,2

25 Se pone de manifiesto que el Kombitest conforme al invento detecta con seguridad los antígenos y anticuerpos de todos los subtipos de HIV1.

Ejemplo 4

30 *Cartografiado de epítomos de los anticuerpos monoclonales contra p24*

4.1. *Síntesis de péptidos*

35 Las correspondientes secuencias parciales de la secuencia de aminoácidos de la proteína de virus p24 de HIV se produjeron mediante una síntesis de péptidos en fase sólida con fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) en un aparato sintetizador de péptidos por tandas (discontinuo), p.ej. de Applied Biosystems A431 ó A433. Para ello se utilizaron en cada caso 4,0 equivalentes de los siguientes derivados de Fmoc-aminoácidos:

40

TABLA 3

45
50
55

A	Fmoc-Ala-OH
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH
D	Fmoc-Asp(tBu)-OH
E	Fmoc-Glu(tBu)-OH
F	Fmoc-Phe-OH
G	Fmoc-Gly-OH
H	Fmoc-His(Trt)-OH
I	Fmoc-Ile-OH

60

5	K	Fmoc-Lys(fenilacetil)-OH
	L	Fmoc-Leu-OH
	M	Fmoc-Met-OH
10	N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
	P	Fmoc-Pro-OH
	Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
15	R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH
	S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
	T	Fmoc-Thr(tBu)-OH
20	U	Fmoc-βalanina
	V	Fmoc-Val-OH
25	W	Fmoc-Trp-OH
	X	Boc-Lys(Fmoc)-OH
	Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
30	Z	Fmoc-ácido amino-caproico

35 Los aminoácidos o derivados de aminoácidos se disuelven en N-metil-pirrolidona. El péptido se constituye en presencia de 400-500 mg de una 4-(2',4'-dimetoxi-fenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi-resina (Tetrahedron Letters 28 (1987), 2107) con una carga de 0,4-0,7 mmol/g (JACS 95 (1973), 1328). Las reacciones de acoplamiento se llevan a cabo durante 20 min en lo que se refiere al derivado Fmoc-aminoácido con 4 equivalentes de dicitclohexil-carbodiimida y 4 equivalentes de N-hidroxi-benzotriazol en dimetil-formamida como medio de reacción durante 20 min. Después de cada etapa de síntesis, el grupo Fmoc se separa con piperidina al 20 % en dimetil-formamida en el transcurso de 20 min. Si los péptidos contienen un puente de disulfuro intramolecular, entonces la secuencia de péptidos protegida con Fmoc, antes del acoplamiento del espaciador artificial, se oxida con yodo en una mezcla de hexafluoro-isopropanol y diclorometano (Kober y colaboradores, de Peptide Academic Press, Nueva York, 1981, páginas 145-147) junto a la fase sólida y a continuación se separa el grupo protector Fmoc situado en el extremo terminal de N, y se acoplan el espaciador así como la biotina situada en el extremo terminal de N.

50 La puesta en libertad del péptido desde la resina para síntesis y la separación de los grupos protectores inestables frente a los ácidos - con excepción del grupo protector fenil-acetilo junto a la lisina - se efectúan con 20 ml de ácido trifluoroacético, 0,5 ml de etano-ditiol, 1 ml de tioanisol, 1,5 g de fenol y 1 ml de agua en el transcurso de 40 min a la temperatura ambiente. A continuación, la solución de reacción se mezcla con 300 ml de diisopropil-éter enfriado y se mantiene a 0°C durante 40 min para la precipitación completa del péptido. El precipitado se separa por filtración, se lava posteriormente con diisopropil-éter, se disuelve con un poco de ácido acético al 50 % y se liofiliza. El material bruto obtenido se purifica mediante una HPLC (de *High Performance Liquid Chromatography* = cromatografía de líquido de alto rendimiento) preparativa, en presencia del material Delta PAK RP C18 (columna 50 x 300 mm, 100 Å, 15 μ) a través de un correspondiente gradiente (Eluyente A: agua, 0,1 % de ácido trifluoroacético. Eluyente B: acetonitrilo, 0,1 % de ácido trifluoroacético) en el transcurso de 120 min. La identidad del material eluido se comprueba mediante espectrometría de masas con proyección de iones.

60

ES 2 187 947 T3

TABLA 4

Secuencias de péptidos de los epítomos de p24

5

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO
1	DKGNSSQVVSQNYPIVQNLQGQMVHQ	1
2	NYPIVQNLQGQMVHQAISPRTLNAW	2
3	QMVHQAISPRTLNAWVKVIEEKAFS	3
4	TLNAWVKVIEEKAFSPEVIPMFSAL	4
5	EKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLN	5
6	MFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQ	6
7	PQDLNTMLNTVGGHQAMQMLKETI	7
8	VGGHQAMQMLKETINEEAEWDRV	8
9	LKETINEEAEWDRVHVPVHAGPIAP	9
10	EWDRVHVPVHAGPIAPGQMPREPRGSD	10
11	GPIAPGQMPREPRGSDIAGTTSTLQE	11
12	PRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPP	12

10

15

20

25

30

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO
13	STLQEQIGWMTNPPPIPVGEIYKRW	13
14	TNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVR	14
15	IYKRWIILGLNKIVRMYSVPSILDI	15
16	NKIVRMYSVPSILDIRQGPKPEFRD	16
17	SILDIRQGPKPEFRDYVDRFYKTLR	17
18	EPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKN	18
19	YKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQN	19
20	QEVKNWMTETLLVQANPDCKTILK	20
21	LLVQANPDCKTILKALGPAATLEE	21
22	KTILKALGPAATLEEMMTACQGVGG	22
23	ATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAE	23
24	QGVGGPGHKARVLAEAMSQVNSAT	24
25	RVLAEAMSQVNSATIMMQRGNFRN	25
26	TNSATIMMQRGNFRNQKKTIVKCFNC	26
27	GNFRNQKKTIVKCFNCGKEGHIKNC	27
28	KCFNCGKEGHIKNCRAPRLKGCWK	28
29	IAKNCRAPRLKGCWCKGKEGHQMKD	29
30	KGCWCKGKEGHQMKDCTERQANFLGKI	30

35

40

45

50

55

60

3A	QAISPRTLNAWVKVI	31
3B	ISPRTLNAWVK	32
9A	INEEAAEWDRVHPVH	33
9B	EEAAEWDRVHP	34
17A	IRQGPKEPFRDYVDR	35
17B	QGPKEPFRDYV	36

4.2. Cartografiado de epítomos

4.2.1. Ensayo inmunológico general

La caracterización de epítomos se llevó a cabo de una manera análoga al sistema de ensayo Enzymun[®] Anti-HIV 1+2 de Boehringer Mannheim (BM 1 165 062). El principio del ensayo es un ELISA en emparejado de 2 etapas con la tecnología de estreptavidina. Sin embargo, en lugar de los sueros humanos se emplearon los diferentes anticuerpos <p24> monoclonales y se midieron con los péptidos en cada caso biotinilados o con p24 recombinante. La detección se efectúa a través de <IgG de ratón>-POD (BM 1 431 323). Se conservaron todos los otros reactivos adicionales, tales como la solución de lavado, tubos revestidos con estreptavidina, ABTS, etc. Las mediciones se llevaron a cabo en el aparato automático para análisis ES 22 ó ES 600 Enzymun[®], de Boehringer Mannheim.

4.2.2. Determinación de las mesetas

La determinación de la concentración inicial óptima de MAK para el cartografiado de epítomos se llevó a cabo según el concepto de sistema de ensayo antes descrito. Como antígeno se utilizó un p24 recombinante biotinilado (cantidad empleada 200 ng/ml).

(Ver Tabla en página siguiente)

TABLA 5

	Concentración de MAK	
	c [$\mu\text{g/ml}$]	Señal mE
MAK<p24>-6A9/5	0	3
	1	208
	5	856
	10	1.231
	20	1.665
	25	1.718
MAK<p24>-6D9/4	0	2
	1	386
	5	1.239
	10	1.835
	20	2.425
	25	2.531
MAK<p24>-2E7/3	0	5
	1	322
	5	1.148
	10	1.708
	20	2.292
	25	2.461
MAK<p24>-4B1/1	0	9
	10	1.205
	25	1.944
	50	2.116
	75	2.451
	100	2.537

La determinación de las mesetas (*plateaus*) se representa gráficamente en las Figuras 1 a 4.

4.2.3. Cartografiado de epítomos

El cartografiado se llevó a cabo con péptidos biotinilados en el extremo terminal de N, que tenían una longitud de 25 aminoácidos que se habían sintetizado en el retículo de a 10 a través de la secuencia de consenso B de p24 de HIV1 (péptidos SEQ ID NO: 1-30). En primer lugar, se midió en el concepto de ensayo indirecto un cartografiado basto con 6 diferentes Mezclas de péptidos A-F (cantidad empleada por péptido 60 ng/ml), que en cada caso contienen 5 diferentes péptidos biotinilados.

ES 2 187 947 T3

	Mezcla A: 1	Mezcla B: 6	Mezcla C: 11
	2	7	12
	3	8	13
5	4	9	14
	5	10	15
	Mezcla D: 16	Mezcla E: 21	Mezcla F: 26
	17	22	27
10	18	23	28
	19	24	29
	20	25	30

TABLA 6
Reactividad de los anticuerpos con la mezcla de péptidos A-F

	MAK 6A9/5		MAK 4B1/1		MAK 6D9/4		MAK 2E7/3	
	[mE]	%	[mE]	%	[mE]	%	[mE]	%
Antígeno patrón	2.098	100	2.402	100	2.966	100	2.903	100
25 Mezcla A	6	0	29	1	925	31	5	0
Mezcla B	8	0	22	1	100	3	2.696	93
30 Mezcla C	15	1	31	1	22	1	5	0
Mezcla D	22	1	1152	48	41	1	4	0
35 Mezcla E	15	1	17	1	16	1	2	0
Mezcla F	24	1	18	1	17	1	3	0

40 Resultado del cartografiado basto: 3 MAK's reaccionan específicamente en cada caso con una mezcla de péptidos (véase la representación gráfica en la Figura 5).

4.2.4. Cartografiado fino

45 En el cartografiado fino se emplearon los péptidos (cantidad empleada 100 mg/ml) procedente de las mezclas reactivas individualmente en el concepto de sistema de ensayo indirecto:

TABLA 7
El péptido MAK<p24>M-4B1/1 con antígenos individuales de la Mezcla D

	p24 rec		Péptido 16		Péptido 17		Péptido 18		Péptido 19		Péptido 20	
	mE		mE		mE		mE		mE		mE	
55 MAK 4B1	2.089	100%	3	0%	297	14%	2	0%	3	0%	0	0%

60

ES 2 187 947 T3

TABLA 8

El péptido MAK<p24>M-2E7/3 con antígenos individuales de la Mezcla B

5		p24 rec		Péptido 6		Péptido 7		Péptido 8		Péptido 9		Péptido 10	
		mE		mE		mE		mE		mE		mE	
10	MAK 2E7	2.111	100 %	6	0 %	3	0 %	23	1 %	2.103	99,6 %	5	0 %

TABLA 9

El péptido MAK<p24>M-6D9/4 con antígenos individuales de la Mezcla A

15		p24 rec		Péptido 1		Péptido 2		Péptido 3		Péptido 4		Péptido 5	
		mE		mE		mE		mE		mE		mE	
20	MAK 6D9	2.282	100 %	3	0 %	23	1 %	922	40 %	5	0 %	4	0 %

TABLA 10

Secuencias de péptidos reactivos

25		Péptido SEQ ID NO	Secuencia	Resultado
30		3	QMVHQAI SPRTLNAWVKVIEEKAFS	reactivo con MAK<p24>M-6D9
		9	LKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAP	reactivo con MAK<p24>M-2E7/3
35		17	SILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLR	reactivo con MAK<p24>M-4B1/1

TABLA 11

Comparación entre secuencias de los epítomos de p24 HIV I Consenso B y Subtipo O

40	MAK 6D9	QMVHQAI SPRTLNAWVKVIEEKAFS	Consenso B
45		QMVHQAI SPRTLNAWVKAIEEKAFN	Subtipo O
	MAK 2E7	LKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAP	Consenso B
50		LKEVINEEA?EWDRTHTPP??GPLPP	Subtipo O
	MAK 4B1	SILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLR	Consenso B
55		SILDI?QGPKEPFRDYVDRFYKTLR	Subtipo O

Según la comparación entre secuencias, los MAK's 6D9 y 4B1 deberían hacer posible la reacción cruzada para p24 (subO), puesto que en ellos se encuentra la mayor homología en la secuencia.

60 Para la limitación adicional del epítomo se llevó a cabo de nuevo un cartografiado fino con los péptidos 3 (= SEQ ID NO 3), 3A (= SEQ ID NO 31), 3B (= SEQ ID NO 32) y MAK<p24>M-6D9/4; los péptidos 9 (= SEQ ID NO 9), 9A (= SEQ ID NO 33),

ES 2 187 947 T3

9B (= SEQ ID NO 34) y MAK<p24>M-2E7/3; así como los péptidos 17 (= SEQ ID NO 17), 17A (= SEQ ID NO 35), 17B (= SEQ ID NO 36) y MAK<p24>M-4B1/1.

TABLA 12

MAK<p24>M-4B1/1 con los antígenos individuales 17, 17A y 17B

SEQ ID NO:	Péptido 17	Péptido 17A	Péptido 17B
	17	35	36
	mE	mE	mE
MAK 4B1/1	612	10	7

TABLA 13

MAK<p24>M-2E7/3 con los antígenos individuales 9, 9A y 9B

SEQ ID NO:	Péptido 9	Péptido 9A	Péptido 9B
	9	33	34
	mE	mE	mE
MAK 2E7/3	1.439	1.330	1.399

TABLA 14

MAK<p24>M-6D9/4 con los antígenos individuales 3, 3A y 3B

SEQ ID NO:	Péptido 3	Péptido 3A	Péptido 3B
	3	31	34
	mE	mE	mE
MAK 6D9/4	958	866	448

De esto se deduce que el epítipo del anticuerpo MAK<p24>M-4B1/1 no puede ser limitado aún más. El epítipo de MAK<p24>M-2E7/3 puede ser minimizado a la secuencia

9B (SEQ ID NO: 34) EEAAEWDRVHP

El epítipo de MAK<p24>M-6D9/4 puede ser acortado a la secuencia

3A (SEQ ID NO: 31) QAISPRTLNAWVKVI

sin mayores pérdidas de señal.

Ejemplo 5

Reconocimiento de subtipos de HIV mediante los anticuerpos monoclonales anti-p24

El ensayo se llevó a cabo de un modo correspondiente a los Ejemplos 1 y 2 de acuerdo con las prescripciones del sistema Enzymun Test[®] Anti-HIV1+2+subtipo O (número de encargo 1557319, Boehringer Mannheim, Alemania). Para realizar el ensayo del reconocimiento de subtipos de HIV se utilizaron sin embargo solamente los receptores R1 y R2, es decir los anticuerpos monoclonales contra p24. Se utilizaron en cada caso 250 ng de MAK/ml.

ES 2 187 947 T3

TABLA 15
Reconocimiento de p24 (de HIV1 y HIV1-SubO) por los MAK's

5	Receptor 1	MAK 4B1/1	MAK 2E7/3	MAK 4B1/1	MAK 6A9	MAK 4B1/1 MAK 6A9/5
10	Receptor 2	MAK 2E7/3	MAK 6D9/4	MAK 6D9/4	MAK 6D9/4	MAK 2E7/3 MAK 6D9/4
	Muestra					
15	SN 1806 (HIV1 Subtipo O)	0,1 (negativo)	0,1 (negativo)	1,2 (positivo)	0,1 (negativo)	1,2 (positivo)
20	SN 1807 (HIV1 Subtipo O)	0,1 (negativo)	0,1 (negativo)	1,7 (positivo)	0,1 (negativo)	1,7 (positivo)
	SN 1796 (HIV1)	1,1 (positivo)	0,1 (negativo)	0,1 (negativo)	0,6 (negativo)	1,2 (positivo)
25	SN 1799 (HIV1)	0,9 (valor límite)	1,3 (positivo)	1,2 (positivo)	1,1 (positivo)	1,4 (positivo)
	SN 1801 (HIV1)	0,8 (valor límite)	1,7 (positivo)	0,8 (valor límite)	1,3 (positivo)	1,7 (positivo)
30	SN 1803 (HIV1)	1,7 (positivo)	2,2 (positivo)	0,1 (negativo)	0,5 (negativo)	2,3 (positivo)

Se pone de manifiesto que el anticuerpo monoclonal MAK<p24>M-4B1/1 y el anticuerpo monoclonal MAK<p24>M-6A9/5 son apropiados en cada caso de modo preferente para su empleo como R1, es decir por el lado de la fase sólida. El anticuerpo monoclonal MAK<p24>M-2E7/3 y el anticuerpo monoclonal MAK<p24>M-6D9/4 son apropiados de modo preferente para el empleo como R2, es decir por el lado de detección. Para un reconocimiento simultáneo efectivo del p24 de HIV1 y HIV1-SubO se emplean en común preferentemente los cuatro anticuerpos.

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el diagnóstico de una infección causada por los HIV mediante un ensayo inmunológico por la detección específica de un antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o de un antígeno p26 de HIV2, mediante un anticuerpo contra la región env de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2, y por lo menos un anticuerpo contra las regiones pol y/o gag procedentes de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2, no abarcando la región gag secuencias de p24/p26.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la detección de la infección causada por los HIV se efectúa mediante un ensayo inmunológico heterogéneo.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque para la detección se emplean por lo menos un receptor R1, que es capaz de fijarse específicamente con el antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o con el antígeno p26 de HIV2 y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida,

por lo menos un receptor R2, que es capaz de fijarse específicamente con el antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o con el antígeno p26 de HIV2 y que lleva una marcación, siendo diferentes los epítomos reconocidos por R1 y R2,

por lo menos un receptor R3, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env, y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida,

por lo menos un receptor R4, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2, que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env, y que lleva una marcación,

por lo menos un receptor R5, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2, que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región pol ó gag, y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida,

por lo menos un receptor R6, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2, que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región pol ó gag, y que lleva una marcación,

se efectúan eventualmente una separación de la fase sólida con respecto de la fase líquida y una determinación de la marcación en una de las dos fases.

4. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, **caracterizado** porque los receptores R1 y R2 son capaces de fijarse específicamente con el antígeno p24 de HIV1, los receptores R3 y R4 son capaces de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env, y los receptores R5 y R6 son capaces de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región gag ó pol.

5. Procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, **caracterizado** porque los receptores R5 y R6 son capaces de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región pol.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado** porque los receptores R5 y R6 son capaces de fijarse específicamente con anticuerpos dirigidos contra la transcriptasa inversa de un HIV.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado** porque los receptores R5 y R6 son capaces de fijarse específicamente con anticuerpos dirigidos contra el antígeno p17 de gag.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-7, **caracterizado** porque también se detecta una infección con el subtipo O de HIV1.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-8, **caracterizado** porque también se detecta una infección con todos los subtipos del grupo M de HIV1.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-9, **caracterizado** porque los receptores R1 y

ES 2 187 947 T3

R2 son en cada caso mezclas de diferentes receptores, que reconocen a diferentes epítomos del antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o diferentes epítomos del antígeno p26 de HIV2.

11. Procedimiento para la detección de anticuerpos contra HIV, **caracterizado** porque se emplea

5

por lo menos un receptor R3, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env, y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida,

10

por lo menos un receptor R4, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env y que lleva una marcación,

15

por lo menos un receptor R5, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región pol ó gag y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida,

20

por lo menos un receptor R6, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región pol ó gag y que lleva una marcación, se efectúan eventualmente una separación de la fase sólida con respecto de la fase líquida y una determinación de la marcación en una de las dos fases, no abarcando la región gag secuencias de p24/p26.

25

12. Anticuerpos monoclonales contra el antígeno p24 de HIV1, que se fijan específicamente a los epítomos de p24 de acuerdo con SEQ ID NO: 3, 9, 17, 31 ó 34.

30

13. Anticuerpos monoclonales contra el antígeno p24 de HIV1, que son producidos por los linajes celulares MAK<p24>M-6A9/5 (número de depósito DSM ACC2310), MAK<p24>M-4B1/1 (número de depósito DSM ACC2299), MAK<p24>M-6D9/4 (número de depósito DSM ACC2300) o MAK<p24>M-2E7/3 (número de depósito DSM ACC2301).

35

14. Anticuerpos monoclonales contra el antígeno p24 de HIV1, que se fijan a p24 de manera equivalente a como lo hacen los anticuerpos monoclonales, que son producidos por los linajes celulares MAK<p24>M-6A9/5 (número de depósito DSM ACC2310), MAK<p24>M-4B1/1 (número de depósito DSM ACC2299), MAK<p24>M-6D9/4 (número de depósito DSM ACC2300) o MAK<p24>M-2E7/3 (número de depósito DSM ACC2301).

40

15. Anticuerpos monoclonales contra el antígeno p24 de HIV1, que se fijan a los mismos epítomos que los anticuerpos monoclonales, que son producidos por los linajes celulares MAK<p24>M-6A9/5 (número de depósito DSM ACC2310), MAK<p24>M-4B1/1 (número de depósito DSM ACC2299), MAK<p24>M-6D9/4 (número de depósito DSM ACC2300) o MAK<p24>M-2E7/3 (número de depósito DSM ACC2301).

45

16. Utilización de por lo menos un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una de las reivindicaciones 13 a 15 en un ensayo de diagnóstico para la detección de una infección causada por los HIV.

50

17. Utilización de por lo menos un anticuerpo monoclonal según una de las reivindicaciones 13 a 15 en un ensayo de diagnóstico en un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10 para la detección de una infección causada por los HIV.

55

18. Utilización de por lo menos un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 12 en combinación con el anticuerpo monoclonal MAK<p24>M-6A9/5 (número de depósito DSM ACC2310).

60

19. Estuche de reactivos para la detección de una infección causada por HIV, que contiene por lo menos un receptor R1, que es capaz de fijarse específicamente con el antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o con el antígeno p26 de HIV2 y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida,

60

por lo menos un receptor R2, que es capaz de fijarse específicamente con el antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o con el antígeno p26 de HIV2 y que lleva una marcación, siendo diferentes los epítomos reconocidos por R1 y R2,

por lo menos un receptor R3, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida,

5 por lo menos un receptor R4, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env y que lleva una marcación,

10 por lo menos un receptor R5, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de las regiones pol ó gag y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida,

15 por lo menos un receptor R6, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de las regiones pol ó gag y que lleva una marcación,

así como eventualmente otros materiales auxiliares usuales, no abarcando la región gag secuencias de p24/p26.

20 20. Estuche de reactivos según la reivindicación 19, **caracterizado** porque como receptores R1 y R2 se emplean los anticuerpos que son producidos por los linajes celulares MAK<p24>M-6A9/5 (número de depósito DSM ACC2310), MAK<p24>M-4B1/1 (número de depósito DSM ACC2299), MAK<p24>M-6D9/4 (número de depósito DSM ACC2300) o MAK<p24>M-2E7/3 (número de depósito DSM ACC2301).

25 21. Tira de ensayo, que contiene

por lo menos un receptor R1, que es capaz de fijarse específicamente con el antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o con el antígeno p26 de HIV2 y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida,

30 por lo menos un receptor R2, que es capaz de fijarse específicamente con el antígeno p24 de HIV1, HIV1-SubO y/o con el antígeno p26 de HIV2 y que lleva una marcación, siendo diferentes los epítomos reconocidos por R1 y R2,

35 por lo menos un receptor R3, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida,

40 por lo menos un receptor R4, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de la región env y que lleva una marcación,

45 por lo menos un receptor R5, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1, HIV1-SubO y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de las regiones pol ó gag, y que está fijado o puede fijarse a una fase sólida,

50 por lo menos un receptor R6, que es capaz de fijarse específicamente con el anticuerpo de HIV1 y/o HIV2 que se ha de determinar, dirigido contra un antígeno procedente de las regiones pol ó gag y que lleva una marcación, así como eventualmente otros materiales auxiliares usuales, no abarcando la región gag secuencias de p24/p26.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

60 Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

Fig. 1

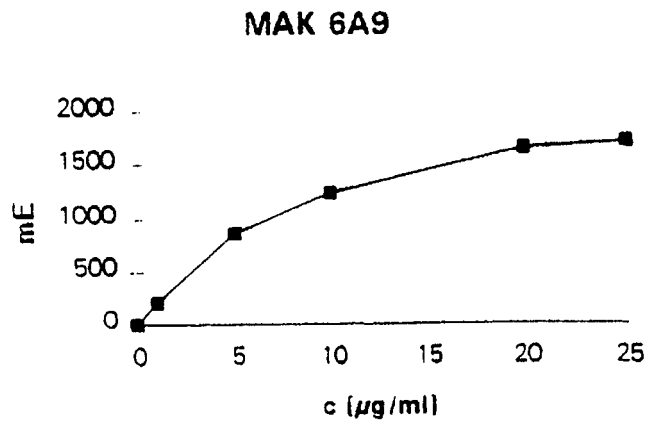


Fig. 2

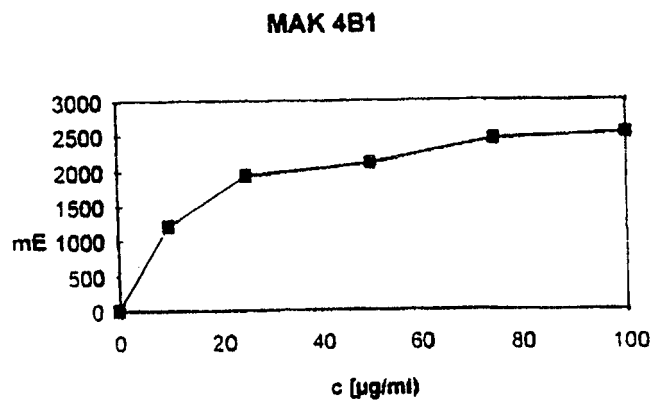


Fig. 3

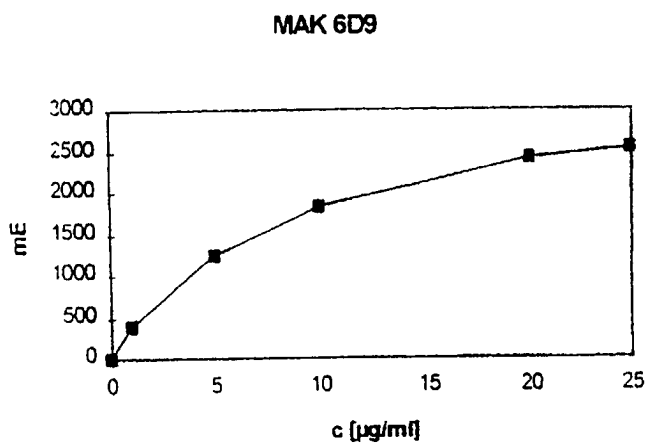


Fig. 4

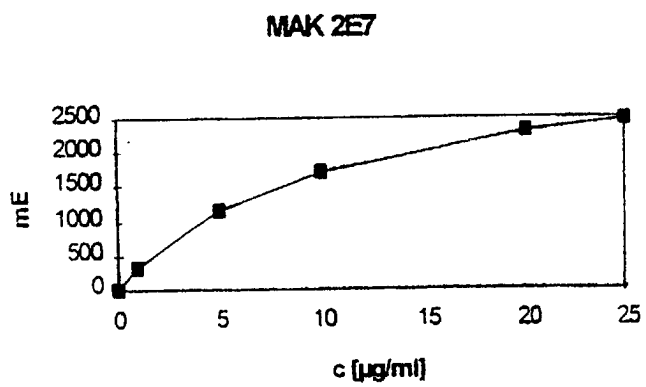
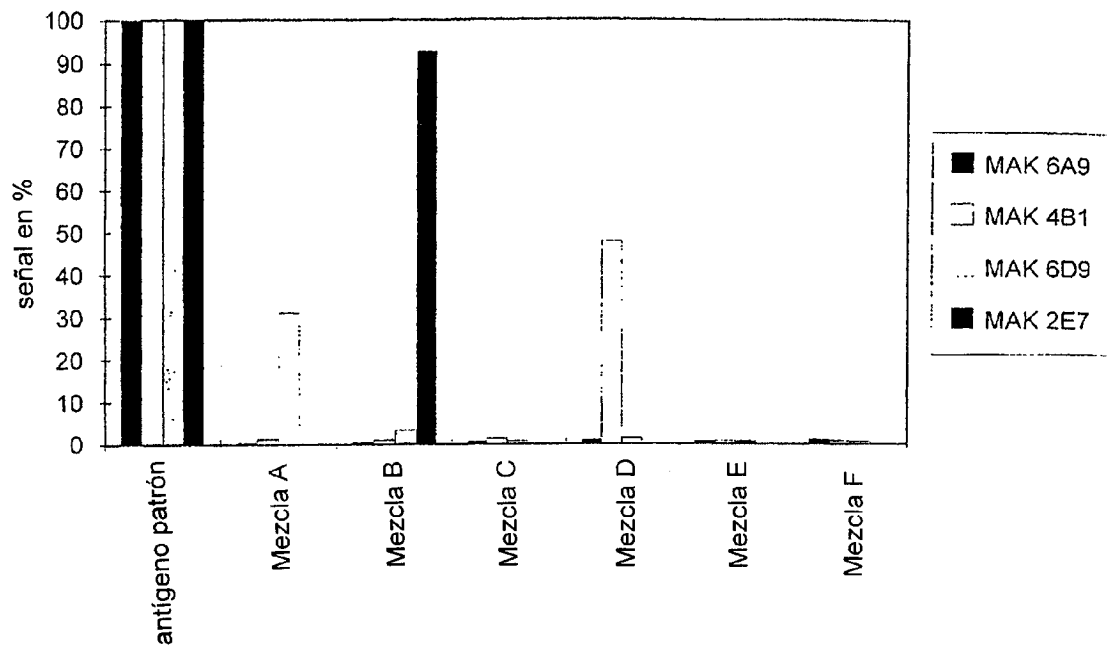


Fig. 5



ES 2 187 947 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) DATOS GENERALES:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: BOEHRINGER MANNHEIM GBMH
 - (B) CALLE: Sandhoferstr. 116
 - 10 (C) LOCALIDAD: Mannheim
 - (E) PAÍS: DE (Alemania)
 - 15 (F) NÚMERO DE CÓDIGO POSTAL: 68305
 - (G) TELÉFONO: 06217593215
 - (H) TELEFAX: 06217594457
 - 20 (ii) DENOMINACIÓN DEL INVENTO: Kombitest HIV
 - (iii) NÚMERO DE LAS SECUENCIAS: 36
 - 25 (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
 - (A) SOPORTE DE DATOS: Disquete
 - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 - 30 (C) SISTEMA OPERATORIO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SISTEMA LÓGICO - SOFTWARE:
 - 35 Patentin Release n° 1.0, versión n° 1.30 (EPA)

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 1:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 25 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - 45 (C) FORMA DE CADENA:
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido
 - 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

55 Asp Lys Gly Asn Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val
1 5 10 15

Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His Gln
20 25

60

ES 2 187 947 T3

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

20 Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His Gln
1 5 10 15

Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp
20 25

25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

45 Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp
1 5 10 15

Val Lys Val Ile Glu Glu Lys Ala Phe Ser
20 25

50

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 187 947 T3

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

5
Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Ile Glu Glu Lys Ala Phe Ser
1 5 10 15
10 Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu
20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 5:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

30 Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu
1 5 10 15
35 Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn
20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 6:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

45 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

55 Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn
1 5 10 15
60 Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln
20 25

ES 2 187 947 T3

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

20 Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln
1 5 10 15
Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile
20 25

25 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

45 Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile
1 5 10 15
Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val
20 25

50 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 187 947 T3

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

5 Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val
 1 5 10 15
10 His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro
 20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 10:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

30 Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro
 1 5 10 15
35 Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp
 20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 11:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

45 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

55 Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp
 1 5 10 15
60 Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln Glu
 20 25

ES 2 187 947 T3

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

```
Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln Glu
20   1           5           10           15
    Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro
    20           25
```

25 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

```
Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro
45   1           5           10           15
    Ile Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp
    20           25
```

50 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 187 947 T3

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

5
Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp
1 5 10 15
10 Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg
20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 15:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

30 Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg
1 5 10 15
35 Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile
20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 16:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

45 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

55 Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile
1 5 10 15
60 Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp
20 25

ES 2 187 947 T3

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

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

20 Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp
1 5 10 15

Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg
20 25

25 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

45 Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg
1 5 10 15

Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn
20 25

50 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 187 947 T3

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

5 Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn
1 5 10 15
10 Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln Asn
20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 20:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20

30 Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln Asn
1 5 10 15
35 Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys
20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 21:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 aminoácidos

45 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

55 Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys
1 5 10 15
60 Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu
20 25

ES 2 187 947 T3

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

20 Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu
1 5 10 15
Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly
20 25

25 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

45 Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly
1 5 10 15
Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu
20 25

50 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 187 947 T3

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

5 Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu
 1 5 10 15
10 Ala Met Ser Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr
 20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 25:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

 (C) FORMA DE CADENA:

 (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

30 Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr
 1 5 10 15
35 Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn
 20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 26:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

45 (B) TIPO: aminoácido

 (C) FORMA DE CADENA:

 (D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

55 Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn
 1 5 10 15
60 Gln Lys Lys Thr Val Lys Cys Phe Asn Cys
 20 25

ES 2 187 947 T3

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

20 Gly Asn Phe Arg Asn Gln Lys Lys Thr Val Lys Cys Phe Asn Cys
1 5 10 15

Gly Lys Glu Gly His Ile Ala Lys Asn Cys
20 25

25 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:

45 Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Ile Ala Lys Asn Cys
1 5 10 15

Arg Ala Pro Arg Leu Lys Gly Cys Trp Lys
20 25

50 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 187 947 T3

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 29:

5 Ile Ala Lys Asn Cys Arg Ala Pro Arg Leu Lys Gly Cys Trp Lys
 1 5 10 15
10 Cys Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp
 20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 30:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 30:

30 Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp
 1 5 10 15
35 Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn Phe Leu Gly Lys Ile
 20 25

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 31:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

45 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 31:

55 Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Ile
 1 5 10 15

60 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 187 947 T3

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

5 (C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 32:

15 Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys
1 5 10

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 33:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

25 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 33:

35 Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His
1 5 10 15

40 (2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

45 (B) TIPO: aminoácido

(C) FORMA DE CADENA:

50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 34:

55 Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro
1 5 10
60

ES 2 187 947 T3

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

10 (C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 35:

20 Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg
1 5 10 15

(2) DATOS ACERCA DE SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

30 (C) FORMA DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 36:

40 Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val
1 5 10

45

50

55

60