



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 537**

51 Int. Cl.:
C07K 14/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06735670 .9**

96 Fecha de presentación : **22.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1866330**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para detectar el virus de la inmunodeficiencia felina.**

30 Prioridad: **09.03.2005 US 75480**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.08.2011

73 Titular/es: **IDEXX LABORATORIES, Inc.**
One Idexx Drive
Westbrook, Maine 04092, US

72 Inventor/es: **Groat, Randall**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 537 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para detectar el virus de la inmunodeficiencia felina

Campo de la invención

La invención está relacionada con la detección de anticuerpos dirigidos contra el virus de la inmunodeficiencia felina.

5 **Antecedentes de la invención**

10 El virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), anteriormente llamado el lentivirus T-linfotrópico felino, fue aislado por primera vez en 1986 de un alojamiento grande para múltiples gatos en Petaluma, California (Pederson y col., Science (1987) 235:790). El VIF infecta a gatos para producir un síndrome similar al SIDA. Aunque el VIF es morfológicamente y patológicamente similar al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se ha demostrado que es antigénicamente distinto del VIH. Al igual que el VIH, una vez que un gato se infecta por el VIF, la enfermedad progresa de una infección primaria (viremia, fiebre, linfadenitis general) a una fase prolongadamente asintomática, seguida de alteración grave de la función inmunitaria producida por una reducción en linfocitos CD4, y produciendo una elevada susceptibilidad a infecciones secundarias y por último la muerte.

15 El VIF se ha clasificado como un miembro de la subfamilia *Lentiviridae* en la familia *Retroviridae*, la familia que incluye los virus de la inmunodeficiencia humana y simia, anemia infecciosa equina, maedi visna de oveja y virus de la artritis-encefalitis caprina (VAEC). El genoma del VIF está organizado como otros lentivirus con tres marcos de lectura abiertos largos correspondientes a *gag*, *pol* y *env* (Talbot y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (1989) 86:5743; Olmsted y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (1989) 86:2448). El gen *gag* codifica los principales componentes estructurales del virus, el gen *env* codifica la glicoproteína de la envoltura y el gen *pol* codifica la proteína polimerasa.

20 El gen *gag* se expresa como una poliproteína de 55 kD que es procesada en tres subunidades: una proteína de la matriz p15, una proteína de la cápside p24 y una proteína de la nucleocápside p10. El gen *pol* codifica tres proteínas: la proteasa, la transcriptasa inversa y una proteína p14.6 de función desconocida. El autoprosesamiento por la porción de proteasa del gen da lugar a las tres proteínas de la región *pol*. Adicionalmente, la proteasa es responsable del procesamiento del precursor *gag*. El gen *pol* se expresa como una proteína de fusión *gag-pol*. El gen de la envoltura se expresa como una glicoproteína de 160 kD, gp160. La antigenicidad de las proteínas del núcleo del VIF es similar a la de otros lentivirus.

25 En todo el mundo se han preparado varias cepas aisladas víricas independientes, y se ha llevado a cabo un cierto número de estudios con el fin de demostrar la estructura de las cepas aisladas: la cepa americana Petaluma, Talbot y col. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 5743-5747; Philipps y col., J. Virol., 1990, 64, 10, 4605-4613), las cepas japonesas (las cepas TM1 y TM2), Miyazawa y col., Arch. Virol., 1989, 108, 59-68, y las cepas aisladas suizas (VIFZ1 y VIFZ2), Morikawa y col., Virus Research, 1991, 21, 53-63.

30 Se han descrito las secuencias de nucleótidos de tres clones províricos derivados de las cepas aisladas del VIF americano (cepa Petaluma) (clones VIF34TF10, VIF14 y cepa aislada PPR) (Olmsted y col. 1989; Philipps y col., 1990; Talbot y col., 1989) y se han comparado con dos cepas aisladas suizas (Morikawa y col. 1991). Esta comparación condujo a Morikawa y col. a especificar la presencia de ciertas regiones conservadas y ciertas regiones variables dentro del gen *env* de VIF. También se han aislado cepas francesas (cepas Wo y Me) (Morailon y col., 1992, Vet. Mic., 31, 41-45).

35 El virus se replica óptimamente en células mononucleares de la sangre y tiene un tropismo por linfocitos T, macrófago peritoneal, macrófago cerebral y astrocitos. En común con los otros retrovirus, el material genético del VIF está compuesto por ARN y la producción de una copia de ADN del ARN vírico es una etapa esencial en la replicación del VIF en el huésped. Esta etapa requiere que la enzima transcriptasa inversa entre en el huésped por el virus invasor. La versión de ADN del genoma vírico se inserta en el material genético de células huésped infectadas en las que sigue residiendo como un provirus. Este provirus se replica cada vez que la célula se divide y puede codificar la producción de nuevas partículas víricas. Las células infectadas por el VIF siguen estando infectadas durante la duración de su vida.

40 Parece que el virus se propaga naturalmente por transmisión horizontal, predominantemente mediante heridas por mordeduras de un gato infectado ya que estos animales derraman cantidades apreciables de virus en la saliva (Yamamoto y col., Am. J. Vet. Res. 1988, 8:1246). Se ha informado de la transmisión vertical, pero es rara.

45 Las actuales pruebas de cribado diagnóstico para la infección por el VIF detectan anticuerpo (Ab) en suero para el

VIF. También están disponibles kits de detección del virus, pero no están extendidos. Están disponibles varias pruebas de diagnóstico para determinar la presencia de anticuerpo para el VIF en animales infectados. Por ejemplo, el kit de prueba de Ab para el VIF PetChek® y el kit de prueba SNAP® Combo FeLV Ag/FIV Ab (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine) son pruebas de diagnóstico basadas en inmunoensayo para la infección por el VIF.

- 5 El detectar la infección por el VIF está siendo cada vez más importante ya que los estudios revelan que la infección por el VIF está extendida mundialmente.

Resumen de la invención

10 En un aspecto, la invención se refiere a polipéptidos *gag* del VIF. En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para determinar si un animal está infectado por el VIF detectando la presencia de anticuerpos para el VIF en una muestra biológica del animal. En diversos otros aspectos, la invención también se refiere a dispositivos y kits para detectar anticuerpos para el VIF en una muestra. Los dispositivos y kits incluyen un polipéptido *gag* para el VIF inmovilizado sobre una fase sólida. El kit incluye un componente de unión específica para un anticuerpo para el VIF conjugado con una marca.

Descripción detallada

15 Antes de describir la presente invención en detalle se definirán varios términos. Como se usa en este documento, las formas singulares “un,” “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo dicte claramente de otro modo.

20 Como se usa en este documento, el término “polipéptido” se refiere a un compuesto de una única cadena o un complejo de dos o más cadenas de restos de aminoácidos ligados por enlaces peptídicos. La(s) cadena(s) puede(n) ser de cualquier longitud. Una proteína es un polipéptido, y los términos se usan sinónimamente. Dentro del alcance de la invención también están incluidas variantes funcionalmente equivalentes y fragmentos de polipéptidos del VIF. El polipéptido puede unirse a uno o más anticuerpos específicos para el polipéptido.

25 Los polipéptidos derivados del VIF incluyen cualquier región del proteoma del VIF que incluye por ejemplo, porciones de las regiones *gag* y *env* y mimótipes de las mismas. Las patentes de EE.UU. n° 5.648.209, 5.591.572 y 6.458.528 describen polipéptidos del VIF derivados de las proteínas *env* y *gag* del VIF.

Las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 se derivan de la *gag* del VIF nativa p24.

SEQ ID NO: 1	KMVS I FMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSANLPTDMA
SEQ ID NO: 2	EILDESLKQMTAEYDRTHPPDGPRPLPYFTAAEIMG
SEQ ID NO: 3	KAKSPRAVQLRQGAKEDYSSFIDRLFAQIDQEQTAEVK
SEQ ID NO: 4	EYDRTHPPDGPRPLPYFTAAEIMGIGLTQEQQAEARFAPAR

Las SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 9 se derivan de la *gag* del VIF nativa p15.

SEQ ID NO: 5	MGNGQGRDWKMAIKRCSNVAVGVGKSKKFGEGNFR
SEQ ID NO: 6	EGNFRWAIRMANVSTGREPGDIPETLDQLRLVICDLQER
SEQ ID NO: 7	ETLDQLRLVICDLQERREKFGSSKEIDMAIVTLKVFVAGLLNMT
SEQ ID NO: 8	LLNMTVSTAAAENMYSQMGLDTRPSMKEAGGKEE
SEQ ID NO: 9	KEEGPPQAYPIQTVNGVPQYVALDP

30 “Especificidad de unión” o “unión específica” se refiere al reconocimiento sustancial de una primera molécula por una segunda molécula, por ejemplo, un polipéptido y un anticuerpo policlonal o monoclonal, o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fv, Fv monocatenario, Fab' o F(ab')2) específico para el polipéptido.

Un "par de unión específica" es un conjunto de dos moléculas diferentes en el que una molécula tiene un área de su superficie o en una cavidad que se une específicamente a y, por tanto, es complementaria de, a un área en la otra molécula. "Componente de unión específica" se refiere a una de estas dos moléculas de unión complementaria. "Par de unión específica" puede referirse, por ejemplo, a un ligando y un receptor. En otro ejemplo, el par de unión específica podría referirse a un par inmunológico, por ejemplo un antígeno y un anticuerpo.

"Unión sustancial" o "unir sustancialmente" se refieren a una cantidad de unión o reconocimiento específico entre moléculas en una mezcla de ensayo bajo condiciones de ensayo particulares. En su aspecto más amplio, unión sustancial se refiere a la diferencia entre la incapacidad de una primera molécula para unirse o reconocer una segunda molécula y la capacidad de la segunda molécula para unirse o reconocer una tercera molécula, de forma que la diferencia sea suficiente para permitir que se realice un ensayo significativo que distinga la unión específica bajo un conjunto particular de condiciones de ensayo que incluye las concentraciones relativas de las moléculas y el tiempo y la temperatura de una incubación. En otro aspecto, una molécula es sustancialmente incapaz de unirse o reconocer otra molécula en un sentido de reactividad cruzada en el que la primera molécula presenta reactividad por una segunda molécula que es inferior al 25%, preferentemente inferior al 10%, más preferentemente inferior al 5% de la reactividad presentada hacia una tercera molécula bajo un conjunto particular de condiciones de ensayo, que incluye la concentración relativa e incubación de las moléculas. La unión específica puede probarse usando varios procedimientos ampliamente conocidos, por ejemplo, un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo de inmunoenzimología (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de transferencia Western.

Animales infectados por el VIF son félicos, que debe entenderse que incluye todos los miembros del orden *Felidae*, que incluye gatos domésticos, leones, tigres, jaguares, leopardos, pumas, ocelotes, etc. Como se usa en este documento, los términos "félico," "gato" o "animal" es una referencia a todos los félicos.

Una "muestra biológica" se refiere a una muestra de un animal sujeto que incluye saliva, sangre completa, suero, plasma u otra muestra conocida por contener anticuerpos para el VIF.

Una "marca" es cualquier molécula que está unida (mediante elementos covalentes o no covalentes, sola o encapsulada) a otra molécula o soporte sólido y que se elige por características específicas que permiten la detección de la molécula marcada. Generalmente, las marcas están comprendidas por, pero no se limitan a, los siguientes tipos: metal particulado y derivados de metal, radioisótopos, reactivos catalíticos o basados en enzimas, sustratos cromogénicos y cromóforos, moléculas fluorescentes y quimioluminiscentes, y fósforos. La utilización de una marca produce una señal que puede detectarse por medios tales como detección de radiación electromagnética o visualización directa, y que opcionalmente puede medirse.

La marca empleada en la presente invención podría ser, pero no se limita a: fosfatasa alcalina; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH"); peroxidasa de rábano (HRP); agentes quimioluminiscentes tales como isoluminol, agentes que fluorescen tales como compuestos de fluoresceína y rodamina; ribozimas; y colorantes. La marca puede producir directamente una señal y, por tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Alternativamente, una marca puede necesitar componentes adicionales tales como sustratos o coenzimas con el fin de producir una señal. La idoneidad y el uso de tales marcas útiles para producir una señal se tratan en la patente de EE.UU. n° 6.489.309 y la patente de EE.UU. n° 5.185.243. Por ejemplo, una marca puede conjugarse con el componente de unión específica en un modo no covalente. Alternativamente, la marca puede conjugarse covalentemente con el componente de unión específica. La patente de EE.UU. n° 3.817.837 y la patente de EE.UU. n° 3.996.345 describen en detalle ejemplos de diversas formas en las que una marca puede conjugarse no covalentemente o covalentemente con el componente de unión específica.

Fase sólida significa un material insoluble en agua poroso o no poroso tal como un soporte o superficie. El soporte puede ser hidrófilo o puede convertirse en hidrófilo e incluye polvos inorgánicos tales como sílice, sulfato de magnesio y alúmina; materiales poliméricos naturales, particularmente materiales celulósicos y materiales derivados de celulosa tales como papeles que contienen fibra, por ejemplo, papel de filtro, papel cromatográfico, etc.; polímeros sintéticos o modificados que se producen naturalmente tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), dextrano reticulado, agarosa, poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, poli(butirato de vinilo), etc., usados tanto por sí mismos como conjuntamente con otros materiales; vidrio disponible como Bioglass, cerámicas, metales y similares. También pueden emplearse montajes naturales o sintéticos tales como liposomas, vesículas de fosfolípidos y células.

La unión de miembros sbp a un soporte o superficie puede llevarse a cabo por técnicas muy conocidas comúnmente disponibles en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Immobilized Enzymes," Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva

York (1978) y Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970). La superficie puede tener una cualquiera de varias formas tales como tira, varilla, partícula, que incluye perla, y similares. En un aspecto, los polipéptidos de la invención incluyen un residuo de cisteína del extremo N para ayudar en la unión de los polipéptidos a la fase sólida.

5 El procedimiento de la invención puede optimizarse de muchas formas, y un experto en la materia podría ajustar simultáneamente las diluciones de muestra, concentraciones de reactivo, temperaturas de incubación y tiempos usados en el procedimiento para realizar la detección de anticuerpos para el VIF en una muestra biológica.

10 En un aspecto de la invención, un polipéptido p15 o p24 del VIF de las SEQ ID. NOS: 1-9 se inmoviliza sobre un soporte sólido adecuado. La muestra biológica se pone en contacto con el polipéptido, al que se unen los anticuerpos dirigidos contra el VIF, si tales anticuerpos están presentes en la muestra. La unión puede detectarse usando una segunda molécula que se une específicamente a los anticuerpos de muestra. La segunda molécula puede marcarse como se describe en este documento, o puede incluir otro resto que pueda unirse a una marca. En una realización adecuada, un reactivo de detección incluye una proteína del VIF que es la misma o similar a la que se usa para capturar anticuerpos dirigidos contra el VIF (si están presentes). En una realización específica de la invención, el reactivo de detección es un anticuerpo dirigido contra IgG de gato. El anticuerpo está conjugado con una marca. La presencia de la marca puede detectarse tras la eliminación del anticuerpo de muestra sin unir y el reactivo de detección de la fase sólida.

15 “Equivalente funcional” o “funcionalmente equivalente” se refiere a polipéptidos relacionados con o derivados de las secuencias de polipéptidos *gag* del VIF en los que la secuencia de aminoácidos se ha modificado por una sustitución, inserción, deleción de aminoácidos única o múltiple, y también secuencias en las que los aminoácidos se han modificado químicamente, tales como análogos de aminoácidos, pero que sin embargo retienen la función sustancialmente equivalente. Las variantes funcionalmente equivalentes pueden producirse como variaciones biológicas naturales o pueden prepararse usando técnicas conocidas tales como síntesis química, mutagénesis dirigida a sitio, mutagénesis al azar o escisión enzimática y/o ligación de aminoácidos. Por tanto, la modificación de la secuencia de aminoácidos para obtener secuencias de variante puede producirse mientras que no se afecte la función del polipéptido.

20 Las variantes funcionalmente equivalentes del VIF dentro del alcance de la invención pueden comprender secuencias conservativamente sustituidas, que significa que uno o más restos de aminoácidos del polipéptido del VIF están sustituidos por restos diferentes que no alteran la estructura secundaria y/o terciaria del polipéptido del VIF. Tales sustituciones pueden incluir la sustitución de un aminoácido por un residuo que tiene propiedades fisicoquímicas similares tales como densidad de carga, tamaño, configuración o hidrofilia/hidrofobia. Sólo para fines de ejemplo, tales sustituciones podrían incluir sustituir un residuo alifático (Ile, Val, Leu o Ala) por otro, o la sustitución de los restos básicos Lys y Arg, restos ácidos Glu y Asp, restos de amida Gln y Asn, restos de hidroxilo Ser y Tyr o restos aromáticos Phe y Tyr. Las variantes conservativas pueden identificarse generalmente modificando una secuencia de polipéptidos de la invención y evaluando la actividad antigénica del polipéptido modificado usando, por ejemplo, un ensayo de inmunohistoquímica, un ensayo de inmunoenzimático de adsorción (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de transferencia Western. Más información referente a la preparación de aminoácidos fenotípicamente silenciosos puede encontrarse en Bowie y col., Science 247:1306-1310 (1990).

30 Dentro del alcance de la invención también se contemplan variantes adicionales, y tales variantes incluyen fusiones del extremo amino y/o carboxilo, por ejemplo, conseguidas mediante adición de secuencias de aminoácidos de cualquier número de restos, además de la inserción de intrasecuencias de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, secuencias de aminoácidos añadidas pueden ser aquellas derivadas de la totalidad o de partes de otros polipéptidos o proteínas, o pueden ser aquellas proporcionadas en las posiciones correspondientes en la proteína de envoltura o vírica del VIF. Péptidos más largos pueden comprender múltiples copias de una o más de las secuencias de polipéptidos. Además, las múltiples copias de los polipéptidos pueden acoplarse a un esqueleto de poliaminoácido tal como un esqueleto de polilisina para formar péptidos de múltiples antígenos (MAP).

35 Variantes de secuencias de aminoácidos delecionales son aquellas en las que uno o más restos de aminoácidos se han eliminado de la secuencia. Las variantes insercionales existen cuando uno o más aminoácidos están integrados en un sitio predeterminado en la proteína, aunque la inserción al azar es una opción con cribado adecuado del producto resultante. En todos los casos, estas y otras variantes del VIF usadas conservan sustancialmente la misma antigenicidad de los polipéptidos del VIF. También se contemplan otras variantes, que incluyen aquellas en las que las sustituciones de aminoácidos se hacen en el área fuera de las regiones de reconocimiento de anticuerpos de la proteína. Las proteínas de fusión que comprenden dos o más secuencias de polipéptidos del VIF también están dentro del alcance de la invención, siempre que las secuencias proporcionen la antigenicidad apropiada. Tales polipéptidos se corresponderán generalmente con al menos un epítipo o mimítipo que es característico del VIF. Por

característico se indica que el epítotope o mimítotope permitirá la detección inmunológica del anticuerpo dirigido contra el VIF en una muestra fisiológica con seguridad razonable. Normalmente será deseable que el epítotope o mimítotope, variante o proteína de fusión sea inmunológicamente distinto (es decir, que no sea reactivo de forma cruzada con anticuerpos que reconocen) de virus distintos del VIF.

5 Una variante antigénicamente activa se diferencia aproximadamente, por ejemplo, en 1, 2, 3, 5, 6, 10, 15 ó 20 restos de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 1 a 9, o un fragmento de las mismas. Si esta comparación requiere el alineamiento, las secuencias se alinean para la máxima homología. Deleciones, inserciones, sustituciones, repeticiones, inversiones o desapareamientos se consideran diferencias. Las diferencias son, preferentemente, diferencias o cambios en un residuo no esencial o una sustitución conservativa. El sitio de variación puede producirse en cualquier sitio en el polipéptido, siempre que el polipéptido de variante resultante sea antigénicamente sustancialmente similar a las SEQ ID NOS: 1 a 9. Las variantes funcionalmente equivalentes a modo de ejemplo incluyen aquellas que muestran el 50% o más de homología de aminoácidos. Preferentemente, tal homología es del 60%, del 70%, o superior al 80%. Sin embargo, tales variantes pueden mostrar un menor porcentaje de homología global y todavía encontrarse dentro del alcance de la invención si tienen regiones conservadas de homología.

15 En algunos casos, uno o más restos de cisteína pueden añadirse a los extremos de los polipéptidos con el fin de facilitar la unión al vehículo específico o de permitir que el enlace disulfuro imite bucles antigénicos y, por tanto, aumente la antigenicidad. Además, un ácido graso o cola hidrófoba puede añadirse a los péptidos para facilitar la incorporación en vehículos de administración y para aumentar la antigenicidad.

20 Los polipéptidos del VIF usados como reactivos de detección pueden ser naturales, es decir, que incluyen toda la proteína del VIF o fragmentos de la misma aislados de una fuente natural, o pueden ser sintéticos. Las proteínas naturales pueden aislarse del virus VIF completo por técnicas convencionales tales como cromatografía de afinidad. Pueden usarse anticuerpos policlonales o monoclonales para preparar una columna de afinidad adecuada por técnicas muy conocidas.

25 Pueden sintetizarse químicamente proteínas que son reactivas de forma inmunológicamente cruzada con una proteína del VIF natural. Por ejemplo, polipéptidos que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, más normalmente menos de aproximadamente 80 aminoácidos, y normalmente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, pueden sintetizarse por el procedimiento de síntesis en fase sólida muy conocido de Merrifield en el que aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena en crecimiento. Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2156). También pueden usarse proteínas recombinantes. Estas proteínas pueden producirse mediante expresión de moléculas de ADN recombinante en células cultivadas que codifican una porción deseada del genoma del VIF. La porción del genoma del VIF puede ser por sí misma natural o sintética, pudiendo obtenerse genes naturales a partir del virus aislado por técnicas convencionales. Por supuesto, el genoma del VIF es ARN, y será necesario transcribir el ARN natural en ADN por técnicas convencionales empleando transcriptasa inversa. También pueden sintetizarse polinucleótidos por técnicas muy conocidas. Por ejemplo, pueden prepararse fragmentos de ADN monocatenario corto por el procedimiento de fosforamidita descrito por Beaucage y Carruthers, 1981, Tett. Letters 22:1859-1862. Entonces, los fragmentos bicatenarios pueden obtenerse tanto sintetizando la cadena complementaria y luego hibridando las cadenas juntas bajo condiciones apropiadas como añadiendo la cadena complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia de cebador apropiada.

30 Los fragmentos de ADN natural o sintético que codifican la proteína del VIF deseada o fragmento de la misma pueden incorporarse a una construcción de ADN que puede introducirse en y expresarse en cultivo celular in vitro. Normalmente, las construcciones de ADN serán adecuadas para la replicación en un huésped unicelular tal como levadura o bacterias. También pueden preverse para la introducción e integración dentro del genoma de células de mamífero cultivadas u otras células eucariotas. Las construcciones de ADN preparadas para la introducción en bacterias o levadura incluirán un sistema de replicación reconocido por el huésped, codificando el fragmento de ADN del VIF el producto de polipéptido deseado, secuencias reguladoras de la iniciación de la transcripción y la traducción unidas al extremo 5' de las secuencias reguladoras de la terminación del ADN del VIF unidas al extremo 3' del fragmento. Las secuencias reguladoras de la transcripción incluirán un promotor heterólogo que es reconocido por el huésped. Convenientemente, una variedad de vectores de expresión adecuados están comercialmente disponibles para varios huéspedes.

50 Para ser útil en los procedimientos de detección de la presente invención, los polipéptidos se obtienen en una forma sustancialmente pura, es decir, normalmente a partir de aproximadamente el 50% en peso/peso o más pureza, sustancialmente libres de proteínas interferentes y contaminantes. Preferentemente, los polipéptidos del VIF se aíslan o se sintetizan en una pureza de al menos el 80% en peso/peso, y más preferentemente en al menos aproximadamente el 95% en peso/peso de pureza. Usando técnicas de purificación de proteínas convencionales

pueden obtenerse composiciones de polipéptidos homogéneas de al menos aproximadamente el 99% en peso/peso de pureza. Por ejemplo, las proteínas pueden purificarse usando los anticuerpos descritos en lo sucesivo usando las columnas de afinidad inmuoabsorbentes descritas anteriormente en este documento.

5 El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo usando técnicas de inmunoensayo muy conocidas para aquellos expertos en la materia que incluyen, pero no se limitan a, el uso de microplacas y dispositivos de flujo lateral. En una realización, una proteína del VIF se inmoviliza sobre un soporte sólido en una localización distinta. La detección de los complejos proteína-anticuerpo sobre el soporte sólido puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.726.010, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad, describe un ejemplo de un dispositivo de flujo lateral, el dispositivo de inmunoensayo 10 SNAP® (IDEXX Laboratories), útil en la presente invención. También pueden usarse pruebas basadas en partículas coloidales tales como la prueba de diagnóstico del VIF comercialmente disponible WITNESS® (Synbiotics Corporation, Lyon, Francia).

15 La inmovilización de uno o más reactivos de captura de analitos, por ejemplo, proteínas del VIF sobre un dispositivo o soporte sólido, se realiza de manera que un reactivo de captura de analitos no será lavado por la muestra, diluyente y/o procedimientos de lavado. Uno o más reactivos de captura de analitos pueden unirse a una superficie mediante adsorción física (es decir, sin el uso de ligadores químicos) o por unión química (es decir, usando ligadores químicos). La unión química puede generar una unión más fuerte de sustancias de unión específica sobre una superficie y proporcionar orientación y conformación definidas de las moléculas unidas a la superficie.

20 En otro aspecto, la invención incluye uno o más reactivos de unión específica marcados que pueden mezclarse con una muestra de prueba antes de la aplicación a un dispositivo de la invención. En este caso no es necesario tener reactivos de unión específica marcados depositados y secados sobre una almohadilla de reactivo de unión específica en el dispositivo. Un reactivo de unión específica marcado, si se añade a una muestra de prueba o se deposita previamente sobre el dispositivo, puede ser, por ejemplo, una proteína del VIF marcada que se une específicamente a un anticuerpo para el VIF.

25 Cualquiera o todas las realizaciones anteriores pueden proporcionarse como un kit. En un ejemplo particular, un kit de ese tipo incluiría un dispositivo completo con reactivos de unión específica (por ejemplo, un reactivo de unión específica marcado no inmovilizado y un reactivo de captura de analitos inmovilizado) y reactivo de lavado, además de reactivo detector y reactivos de control positivo y negativo, si se desea o es apropiado. Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizadores, tampones y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos 30 pueden variarse para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvo secos, normalmente liofilizados, que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para combinarse con una muestra.

35 El dispositivo también puede incluir un reactivo líquido que transporta material sin unir (por ejemplo, muestra de fluido sin reaccionar y reactivos de unión específica sin unir) lejos de la zona de reacción (fase sólida). Un reactivo líquido puede ser un reactivo de lavado y sólo sirve para eliminar material sin unir de la zona de reacción, o puede incluir un reactivo detector y servir para tanto eliminar material sin unir como para facilitar la detección del analito. Por ejemplo, en el caso de un reactivo de unión específica conjugado con una enzima, el reactivo detector incluye un sustrato que produce una señal detectable tras la reacción con el conjugado enzima-anticuerpo en la zona reactiva. 40 En el caso de un reactivo de unión específica marcado conjugado con una molécula radiactiva, fluorescente o fotoabsorbente, el reactivo detector sirve simplemente de una disolución de lavado que facilita la detección de la formación del complejo en la zona reactiva lavando el reactivo marcado sin unir.

45 Dos o más reactivos líquidos pueden estar presentes en un dispositivo, por ejemplo, un dispositivo puede comprender un líquido reactivo que sirve de reactivo de lavado y un reactivo líquido que sirve de reactivo detector y facilita la detección del analito.

Un reactivo líquido puede incluir adicionalmente una cantidad limitada de un "inhibidor", es decir, una sustancia que bloquea el revelado del producto final detectable. Una cantidad limitada es una cantidad de inhibidor suficiente para bloquear el revelado del producto final hasta que la mayoría o todo el exceso de material sin unir sea transportado lejos de la segunda región, momento en el que se produce producto final detectable.

50 **Ejemplo**

Se obtuvieron muestras de sangre de gatos negativos para el VIF y gatos infectados naturalmente por el VIF. Las muestras se confirmaron como negativas o positivas para el anticuerpo para el VIF mediante una prueba

confirmatoria de inmunotransferencia Western. En caso de necesidad, las muestras de suero y plasma se almacenaron congeladas hasta el ensayo.

5 El análisis de ELISA en microplacas se realizó en muestras de suero recogidas de gatos negativos para e infectados por el VIF confirmados en una forma de ensayo indirecto con polipéptidos de VIF individuales de las SEQ ID NOS: 1-9 sobre la fase sólida y un reactivo comercial de anticuerpo dirigido contra IgG de felino conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Bangor, ME, EE.UU.).

10 Los polipéptidos se sintetizaron usando un instrumento comercial y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las disoluciones madre de polipéptidos se prepararon a 5 mg/ml en DMSO. Entonces, los polipéptidos se recubrieron sobre pocillos de microplacas (péptido a 10 ug/ml en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, 100 ul/pocillo). Entonces, las placas se bloquearon/recubrieron con 2% de Tween-20/2,5% de sacarosa, seguido de secado en bolsas de Mylar con desecante. También podría haberse usarse péptido conjugado con BSA.

15 Para los ensayos, se añadieron a los pocillos muestras de suero felino (100 ul/pocillo diluidas 1/1000 en 50% de suero bovino fetal) y las placas se incubaron durante quince minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, las microplacas se lavaron con PBS/Tween. Se añadió a los pocillos anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de gato conjugado con peroxidasa (diluido 1/4000 a partir de anticuerpo dirigido contra IgG de gato conjugado con peroxidasa en 50% de suero bovino fetal). Las placas se incubaron durante otros quince minutos a temperatura ambiente y se lavaron una segunda vez con PBS/Tween. Se añadió sustrato de peroxidasa (100 ul/pocillo, sustrato de peroxidasa de tetrametilbencidina) y las placas se incubaron por tercera vez durante diez minutos a temperatura ambiente. A las placas se añadió una disolución de parada de ácido fluorhídrico (50 ul/pocillo). La unión del anticuerpo de muestra se midió determinando la actividad de peroxidasa (producto coloreado) con un espectrofotómetro (A 650 nm). Se determinó que el corte positivo/negativo era la absorbancia media de las muestras negativas más tres desviaciones estándar para esas muestras. También se ejecutó el kit de prueba del anticuerpo dirigido contra el VIH IDEXX PetCheK® en estas muestras como una prueba de referencia.

25 Las Tablas 1 a 9 muestran los resultados de ELISA en microplaca para los polipéptidos de SEQ. ID: 1 a SEQ. ID: 9, respectivamente. Cada uno de estos polipéptidos podría usarse para detectar anticuerpo para el VIF en felinos infectados por el VIF.

Tabla 1.

muestra	SEQ ID 1 A (650 nm)	SEQ ID 1 resultado	PetChek A (650 nm)	PetChek resultado		
2426:100	1,085	positivo	0,546	positivo		
14828	0,329	positivo	1,295	positivo		
Jack	2,342	positivo	1,539	positivo		
18110-97	0,501	positivo	1,067	positivo		
Detroit	0,704	positivo	2,068	positivo		
B30190-8	0,371	positivo	1,561	positivo		
1219 ARL	0,235	positivo	1,715	positivo		
3794-145B	0,556	positivo	1,084	positivo		
Cornell NEG	0,059	negativo	0,048	negativo	media de NEG	0,071
Avery 2253-9 NEG	0,058	negativo	0,045	negativo	DE	0,052
3794:145A NEG	0,199	negativo	0,051	negativo	3DE	0,156
Weege NEG	0,063	negativo	0,045	negativo	media + 3DE	0,227

Tabla 2.

muestra	SEQ ID 2 A (650 nm)	SEQ ID 2 resultado	PetChek A (650 nm)	PetChek resultado		
18110-97	0,721	positivo	1,067	positivo		
2899-129 stray	0,528	positivo	1,368	positivo		
B30190-8	0,383	positivo	1,561	positivo		
1219 ARL	0,247	positivo	1,715	positivo		
Cornell NEG	0,053	negativo	0,048	negativo	media de NEG	0,085
Avery 2253-9 NEG	0,196	negativo	0,045	negativo	DE	0,062
3794:145A NEG	0,065	negativo	0,051	negativo	3DE	0,187
Weege NEG	0,065	negativo	0,045	negativo	media + 3DE	0,272

Tabla 3.

muestra	SEQ ID 3 A (650 nm)	SEQ ID 3 resultado	PetChek A (650 nm)	PetChek resultado		
18110-97	0,340	positivo	1,067	positivo		
B30190-8	0,515	positivo	1,561	positivo		
3794-145B	0,413	positivo	1,084	positivo		
2426:100	0,285	positivo	0,546	positivo		
14828	0,269	positivo	1,295	positivo		
3794-151 L	0,293	positivo	1,056	positivo		
Cornell NEG	0,056	negativo	0,048	negativo	media de NEG	0,060
Avery 2253-9 NEG	0,070	negativo	0,045	negativo	DE	0,014
3794:145A NEG	0,085	negativo	0,051	negativo	3DE	0,043
Weege NEG	0,066	negativo	0,045	negativo	media + 3DE	0,103

Tabla 4.

muestra	SEQ ID 4 A (650 nm)	SEQ ID 4 resultado	PetChek A (650 nm)	PetChek resultado		
1219 ARL	0,482	positivo	1,715	positivo		
1033 ARL	0,446	positivo	2,029	positivo		
18110-91	0,555	positivo	1,583	positivo		
14828	0,765	positivo	1,295	positivo		
Jack	0,661	positivo	1,539	positivo		
17992-89	0,512	positivo	1,843	positivo		
18110-97	0,593	positivo	1,067	positivo		
Detroit	0,647	positivo	2,068	positivo		
Rodney	0,499	positivo	1,819	positivo		
2899-129 stray	1,713	positivo	1,368	positivo		
B30190-8	0,567	positivo	1,561	positivo		
3794-145B	1,292	positivo	1,084	positivo		
3794-151L	1,163	positivo	1,056	positivo		
3794-151F	0,756	positivo	1,930	positivo		
Cornell NEG	0,078	negativo	0,048	negativo	media de NEG	0,097
Avery 2253-9 NEG	0,158	negativo	0,045	negativo	DE	0,079
3794:145A NEG	0,084	negativo	0,051	negativo	3DE	0,236
Weege NEG	0,268	negativo	0,045	negativo	media + 3DE	0,333

Tabla 5.

muestra	SEQ ID 5 A (650 nm)	SEQ ID 5 resultado	PetChek A (650 nm)	PetChek resultado
2426:100	2,560	positivo	0,546	positivo
1219 ARL	0,400	positivo	1,715	positivo
1033 ARL	0,211	positivo	2,029	positivo
14828	0,198	positivo	1,295	positivo
Jack	0,225	positivo	1,539	positivo
18110-97	0,828	positivo	1,067	positivo

2899-129 stray	0,320	positivo	1,368	positivo		
PET 2172-72	0,725	positivo	1,156	positivo		
3794-145B	0,344	positivo	1,084	positivo		
3794-151F	0,189	positivo	1,930	positivo		
Cornell NEG	0,048	negativo	0,048	negativo	media de NEG	0,054
SPF Avery 2253-9	0,070	negativo	0,045	negativo	DE	0,010
3794:145A	0,053	negativo	0,051	negativo	3DE	0,031
Weege	0,069	negativo	0,045	negativo	media + 3DE	0,084

Tabla 6.

muestra	SEQ ID 6 A (650 nm)	SEQ ID 6 resultado	PetChek A (650 nm)	PetChek resultado		
2426:100	0,808	positivo	0,546	positivo		
2426-91 A	0,151	positivo	2,001	positivo		
1219 ARL	0,256	positivo	1,715	positivo		
Jack	0,502	positivo	1,539	positivo		
17992-89	0,275	positivo	1,843	positivo		
18110-97	0,521	positivo	1,067	positivo		
Detroit	0,703	positivo	2,068	positivo		
Rodney	0,256	positivo	1,819	positivo		
2899-129 stray	0,157	positivo	1,368	positivo		
PET 2172-72	0,739	positivo	1,156	positivo		
3794-145B	0,213	positivo	1,084	positivo		
3794-151L	0,175	positivo	1,056	positivo		
3794-151F	0,306	positivo	1,930	positivo		
Cornell NEG	0,065	negativo	0,048	negativo	media de NEG	0,056
SPF Avery 2253-9	0,080	negativo	0,045	negativo	DE	0,012
3794:145A	0,050	negativo	0,051	negativo	3DE	0,037
Weege	0,064	negativo	0,045	negativo	media + 3DE	0,093

Tabla 7.

muestra	SEQ ID 7	SEQ ID 7	PetChek	PetChek		
	A (650 nm)	resultado	A (650 nm)	resultado		
2426:100	2,703	positivo	0,546	positivo		
2426-91A	0,459	positivo	2,001	positivo		
2426-91C	0,487	positivo	1,067	positivo		
1219 ARL	0,714	positivo	1,715	positivo		
1033 ARL	0,553	positivo	2,029	positivo		
14828	0,315	positivo	1,295	positivo		
Jack	0,859	positivo	1,539	positivo		
18110-97	1,251	positivo	1,067	positivo		
2899-129 stray	0,407	positivo	1,368	positivo		
PET 2172-72	0,444	positivo	1,156	positivo		
B30190-8	0,734	positivo	1,561	positivo		
3794-145B	0,502	positivo	1,084	positivo		
3794-151L	0,368	positivo	1,056	positivo		
3794-151F	0,648	positivo	1,930	positivo		
Cornell NEG	0,146	negativo	0,048	negativo	media de NEG	0,102
SPF Avery 2253-9	0,132	negativo	0,045	negativo	DE	0,060
3794:145A	0,184	negativo	0,051	negativo	3DE	0,181
Weege	0,165	negativo	0,045	negativo	media + 3DE	0,283

Tabla 8.

muestra	SEQ ID 8	SEQ ID 8	PetChek	PetChek
	A (650 nm)	resultado	A (650 nm)	resultado
1219 ARL	0,294	positivo	1,715	positivo
18110-91	0,461	positivo	1,583	positivo
14828	0,310	positivo	1,295	positivo
Jack	0,467	positivo	1,539	positivo
18110-97	0,403	positivo	1,067	positivo
3794-145B	0,491	positivo	1,084	positivo

muestra	SEQ ID 8 A (650 nm)	SEQ ID 8 resultado	PetChek A (650 nm)	PetChek resultado		
3794-151L	0,992	positivo	1,056	positivo		
3794-151F	0,301	positivo	1,930	positivo		
Cornell NEG	0,076	negativo	0,048	negativo	media de NEG	0,066
SPF Avery 2253-9	0,066	negativo	0,045	negativo	DE	0,024
3794:145A	0,116	negativo	0,051	negativo	3DE	0,073
Weege	0,078	negativo	0,045	negativo	media + 3DE	0,139

Tabla 9.

muestra	SEQ ID 9 A (650 nm)	SEQ ID 9 resultado	PetChek A (650 nm)	PetChek resultado		
2426:100	0,417	positivo	0,546	positivo		
2426-91 A	1,040	positivo	2,001	positivo		
2426-91C	0,481	positivo	1,067	positivo		
1219 ARL	0,269	positivo	1,715	positivo		
14828	0,224	positivo	1,295	positivo		
Jack	0,234	positivo	1,539	positivo		
17992-89	0,318	positivo	1,843	positivo		
18110-97	0,653	positivo	1,067	positivo		
Detroit	0,504	positivo	2,068	positivo		
Rodney	0,323	positivo	1,819	positivo		
2899-129 stray	0,506	positivo	1,368	positivo		
3794-145B	0,393	positivo	1,084	positivo		
3794-151F	0,211	positivo	1,930	positivo		
Cornell NEG	0,053	negativo	0,048	negativo	media de NEG	0,060
SPF Avery 2253-9	0,081	negativo	0,045	negativo	DE	0,017
3794:145A	0,086	negativo	0,051	negativo	3DE	0,051
Weege	0,073	negativo	0,045	negativo	media + 3DE	0,111

Aunque en este documento se han descrito diversas realizaciones específicas de la presente invención, debe

entenderse que la invención no se limita a aquellas realizaciones precisas y que diversos cambios o modificaciones pueden ser efectuados en la misma por un experto en la materia sin apartarse del alcance de la invención como se reivindica.

Listado de secuencias

- 5 <110> IDEXX Laboratories, Inc.
 Groat, Randall G.
 <120> Procedimiento y dispositivo para detectar el virus de la inmunodeficiencia felina
 <130> MBHB-04-830-A
 <160> 9
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia felina
- 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Polipéptido derivado de la gag del VIF nativa p24.
 <400> 1

```

Lys Met Val Ser Ile Phe Met Glu Lys Ala Arg Glu Gly Leu Gly Gly
1           5           10           15

Glu Glu Val Gln Leu Trp Phe Thr Ala Phe Ser Ala Asn Leu Thr Pro
          20           25           30

Thr Asp Met Ala
          35
  
```

- 20 <210> 2
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia felina
 <220>
- 25 <221> MISC_FEATURE
 <223> Polipéptido derivado de la gag del VIF nativa p24.
 <400> 2

Glu Ile Leu Asp Glu Ser Leu Lys Gln Met Thr Ala Glu Tyr Asp Arg
 1 5 10 15

Thr His Pro Pro Asp Gly Pro Arg Pro Leu Pro Tyr Phe Thr Ala Ala
 20 25 30

Glu Ile Met Gly
 35

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

5 <213> Virus de la inmunodeficiencia felina

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Polipéptido derivado de la gag del VIF nativa p24.

<400> 3

Lys Ala Lys Ser Pro Arg Ala Val Gln Leu Arg Gln Gly Ala Lys Glu
 1 5 10 15

Asp Tyr Ser Ser Phe Ile Asp Arg Leu Phe Ala Gln Ile Asp Gln Glu
 20 25 30

Gln Asn Thr Ala Glu Val Lys
 35

10

<210> 4

<211> 41

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia felina

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Polipéptido derivado de la gag del VIF nativa p24.

<400> 4

Glu Tyr Asp Arg Thr His Pro Pro Asp Gly Pro Arg Pro Leu Pro Tyr
 1 5 10 15

Phe Thr Ala Ala Glu Ile Met Gly Ile Gly Leu Thr Gln Glu Gln Gln
 20 25 30

Ala Glu Ala Arg Phe Ala Pro Ala Arg
 35 40

<210> 5

<211> 36

<212> PRT

5 <213> Virus de la inmunodeficiencia felina

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Polipéptido derivado de la gag del VIF nativa p15.

<400> 5

Met Gly Asn Gly Gln Gly Arg Asp Trp Lys Met Ala Ile Lys Arg Cys
 1 5 10 15

Ser Asn Val Ala Val Gly Val Gly Gly Lys Ser Lys Lys Phe Gly Glu
 20 25 30

Gly Asn Phe Arg
 35

10

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia felina

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Polipéptido derivado de la gag del VIF nativa p15.

<400> 6

Glu Gly Asn Phe Arg Trp Ala Ile Arg Met Ala Asn Val Ser Thr Gly
 1 5 10 15

Arg Glu Pro Gly Asp Ile Pro Glu Thr Leu Asp Gln Leu Arg Leu Val
 20 25 30

Ile Cys Asp Leu Gln Glu Arg
 35

<210> 7

<211> 45

<212> PRT

5 <213> Virus de la inmunodeficiencia felina

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Polipéptido derivado de la gag del VIF nativa p15.

<400> 7

Glu Thr Leu Asp Gln Leu Arg Leu Val Ile Cys Asp Leu Gln Glu Arg
 1 5 10 15

Arg Glu Lys Phe Gly Ser Ser Lys Glu Ile Asp Met Ala Ile Val Thr
 20 25 30

Leu Lys Val Phe Ala Val Ala Gly Leu Leu Asn Met Thr
 35 40 45

10

<210> 8

<211> 35

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia felina

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Polipéptido derivado de la gag del VIF nativa p15.

<400> 8

Leu Leu Asn Met Thr Val Ser Thr Ala Ala Ala Ala Glu Asn Met Tyr
 1 5 10 15

Ser Gln Met Gly Leu Asp Thr Arg Pro Ser Met Lys Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

Lys Glu Glu
 35

<210> 9

<211> 25

<212> PRT

5 <213> Virus de la inmunodeficiencia felina

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Polipéptido derivado de la gag del VIF nativa p15.

<400> 9

Lys Glu Glu Gly Pro Pro Gln Ala Tyr Pro Ile Gln Thr Val Asn Gly
 1 5 10 15

Val Pro Gln Tyr Val Ala Leu Asp Pro
 20 25

10

REIVINDICACIONES

- 1.- Un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.
- 5 2.- Un procedimiento de detección de la presencia de anticuerpos para el VIF en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:
- poner en contacto una muestra biológica de un animal con el polipéptido del VIF de la reivindicación 1, y
- detectar si los anticuerpos para el VIF en la muestra se unen sustancialmente al polipéptido, detectándose así la presencia de anticuerpos para el VIF en la muestra.
- 10 3.- Un procedimiento para detectar una infección por el VIF en un animal que comprende:
- (a) poner en contacto una muestra biológica del animal con una fase sólida que tiene unida a la misma el polipéptido del VIF de la reivindicación 1;
- (b) poner en contacto la muestra y la fase sólida con un componente de unión específica para un anticuerpo para el VIF, en el que el componente de unión específica está conjugado con una marca;
- 15 (c) detectar la marca, detectándose así una infección por el VIF en el animal.
- 4.- El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el componente de unión específica para un anticuerpo para el VIF es un anticuerpo dirigido contra IgG de gato.
- 5.- Un procedimiento para detectar una infección por el VIF en un animal que comprende:
- 20 (a) poner en contacto una muestra biológica del animal con un componente de unión específica para un anticuerpo para el VIF, en el que el componente de unión específica está conjugado con una marca;
- (b) poner en contacto la muestra y el componente de unión específica para el anticuerpo de muestra conjugado con una marca con la fase sólida que tiene unida a la misma el polipéptido del VIF de la reivindicación 1; y
- (c) detectar la marca, detectándose así una infección por el VIF en el animal,
- 25 6.- El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el componente de unión específica para un anticuerpo para el VIF es un anticuerpo dirigido contra IgG de gato.
- 7.- Un dispositivo para detectar una infección por el VIF en un animal que comprende una fase sólida que tiene inmovilizada sobre la misma el polipéptido del VIF de la reivindicación 1.
- 30 8.- Un kit para detectar una infección por el VIF en un animal que comprende el dispositivo de la reivindicación 7 y un componente de unión específica para un anticuerpo para el VIF, en el que el componente de unión específica está conjugado con una marca.
- 9.- El kit de la reivindicación 8, en el que el componente de unión específica para un anticuerpo para el VIF es un anticuerpo dirigido contra IgG de gato.