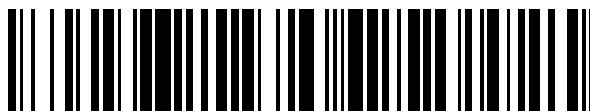


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 624**

51 Int. Cl.:
C07K 14/195 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08006603 .8**
96 Fecha de presentación: **31.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **1982993**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2008**

54 Título: **DETECCIÓN DE INFECCIONES PRIMARIAS POR PATÓGENOS.**

30 Prioridad:
20.04.2007 EP 07008124

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.11.2011

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**Faatz, Elke, Dr.;
Schaarschmidt, Peter, Dr.;
Scholz, Christian, Dr. y
Schmitt, Urban**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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).

ES 2 368 624 T3

DESCRIPCIÓN

Detección de infecciones primarias por patógenos

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos de fusión adecuados como antígenos de ensayo en la detección de infecciones por patógenos, particularmente de infecciones primarias por patógenos. Además, la invención se refiere a métodos para detectar y determinar diferencialmente los anticuerpos IgM resultantes de una infección por un patógeno. Además, se proporcionan los reactivos de ensayo para llevar a cabo dichos métodos.
- 10 Aparte de la tecnología de PCR, los ensayos inmunológicos todavía desempeñan un importante papel en la serología de la infección. Mediante la determinación específica de las diferentes clases de inmunoglobulina, la inmunología permite analizar el estadio de una enfermedad. Mediante la determinación de los títulos de IgM y de IgG frente a determinados antígenos víricos, resulta posible distinguir entre diferentes estadios de infección, por ejemplo infecciones agudas, infecciones recurrente, infecciones crónicas/persistentes o estadios de enfermedad post-infecciosos. Por ejemplo, las moléculas de IgG contra las glucoproteínas víricas únicamente se generan en un estadio tardío de una infección por citomegalovirus (Schoppel *et al.* JID 175:533-544, 1997; Eggers *et al.*, J. Med. Virol. 63:135-142, 2001).
- 15 Un aspecto crucial de una detección específica fiable de IgG e IgM en presencia de la otra clase de inmunoglobulina respectiva es la concentración efectiva de epítomos o la densidad efectiva de epítomos del antígeno de detección. Una concentración de epítomos efectiva elevada se refiere a una densidad de epítomos elevada y a que todos los epítomos son accesibles a la unión de anticuerpos. En contraste con lo anterior, también los agregados de polipéptidos presentan una elevada concentración de epítomos, aunque la concentración efectiva de epítomos es reducida debido a que los epítomos se encuentran parcial o completamente enterrados u ocultos y de esta manera no resultan accesibles a la unión de anticuerpos. Las concentraciones elevadas de epítomos son una precondition para un reconocimiento específico de IgM, mientras que las concentraciones reducidas de epítomos son una precondition para el reconocimiento específico de IgG. En un ensayo clásico de IgM de tipo sándwich, que detecta moléculas de IgM contra el antígeno A, se utiliza un antígeno multimérico A como antígeno de captura inmovilizado. El mismo antígeno multimérico A que porta un grupo informador se utiliza como antígeno de detección. El analito
- 20 IgM se une al antígeno de captura y al antígeno de detección, de manera que el grupo informador queda inmovilizado en una fase sólida (por ejemplo perlas recubiertas de estreptavidina). Con el fin de evitar interferencias de las moléculas de IgG dirigidas contra A, se añade al ensayo un antígeno monomérico A no marcado como agente de eliminación de interferencias (patente WO n° 98/123955, patente US n° 6.489.129 B1). De acuerdo con lo anterior, un ensayo específico de IgG de tipo sándwich (patentes WO n° 98/123961, US n° 6.645.732 B1) puede comprender un antígeno monomérico para la detección de IgG y un antígeno multimérico no marcado para evitar las interferencias con IgM.
- 25 El principio que permite una detección específica de moléculas de IgM y de IgG se basa en sus estructuras moleculares respectivas. La IgM pentamérica presenta diez paratopos idénticos para la unión de antígenos, mientras que la IgG monomérica presenta únicamente dos sitios de unión en cada molécula. La detección de IgG se basa en la afinidad para el analito, mientras que la detección de IgM se basa en su avidéz. En el primer caso, la unión se consigue mediante una interacción de alta afinidad entre epítopo y paratopo (es decir, sitio de unión de antígeno IgG); en el último caso, se consigue mediante una potenciación cooperativa de varias interacciones de baja afinidad ("avidéz" se refiere a que las constantes individuales de disociación no se suman sino que se multiplican, es decir, una interacción relativamente débil, con una k_D de $\sim 10^{-5}$ M resulta incrementada por dos sucesos independientes de unión, rindiendo una interacción de alta afinidad, con una k_D de $\sim 10^{-10}$ M). De esta manera, puede afirmarse como regla general que los antígenos monoméricos se utilizan para la detección de IgG y se utilizan antígenos oligoméricos/multiméricos para la detección de IgM.
- 30 La oligomerización o multimerización de antígenos puede conseguirse mediante entrecruzamiento químico de antígenos monoméricos con entrecruzantes homobifuncionales o heterobifuncionales. Generalmente, la oligomerización o multimerización puede optimizarse mediante el ajuste de las condiciones de reacción (concentración de proteínas y entrecruzante, pH, temperatura, tasa de agitación y tiempo de reacción), lo que consume mucho tiempo y resulta laborioso. Sin embargo, pueden alcanzarse diferentes grados de entrecruzamiento en diferentes lotes, lo que requiere procedimientos posteriores de fraccionamiento y/o de calibración. Además, un grado más alto de entrecruzamiento normalmente conduce a una reducción de la solubilidad, conduciendo a problemas en el rendimiento del ensayo. De esta manera, se desea encontrar un método mejorado para proporcionar antígenos multiméricos de un modo definido y reproducible.
- 35 La patente US n° 6.207.420 describe una secuencia de fusión que comprende una proteína portadora que comprende una proteína de *E. coli* que presenta una probabilidad de solubilidad predicha de por lo menos 90% fusionada con un péptido o proteína heteróloga diana. Preferentemente, el péptido o proteína heteróloga normalmente es insoluble al expresarse en bacterias.
- 40 La patente WO n° 03/000878 describe una proteína de fusión que comprende por lo menos un polipéptido diana y cadena arriba del mismo por lo menos un chaperón de FKBP, que se selecciona de entre el grupo que consiste de

FkpA, SlyD y factor inductor. El polipéptido diana puede ser un producto génico de mamífero o un producto génico de un patógeno de mamífero.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un polipéptido de fusión que comprende:

- (i) por lo menos un dominio de multimerización y
- (ii) una pluralidad de copias de un segmento de epítipo procedente de un patógeno,

en el caso de que el dominio de multimerización sea un chaperón procariótico o eucariótico seleccionado de entre el grupo que consiste de FkpA, Skp, SecB, Hsp25, MIP, GroEL, ClpB y ClpX.

Las moléculas de polipéptido de fusión son capaces de formar un multímero. Un multímero comprende una pluralidad de subunidades monoméricas asociadas mediante interacciones no covalentes a través del dominio de multimerización. El multímero puede formarse mediante, por ejemplo, incubación de moléculas de polipéptido de fusión bajo condiciones adecuadas.

Los polipéptidos de fusión de la presente invención son fusiones genéticas que pueden producirse en cantidades elevadas y calidad reproducible según métodos estándares. Los polipéptidos de fusión y los multímeros formados a partir de los mismos presentan elevadas estabilidad y solubilidad y de esta manera son antígenos de ensayo excelentes

en métodos para detectar anticuerpos que resultan de una infección por un patógeno. Preferentemente, los polipéptidos de fusión se utilizan en una determinación de anticuerpos IgM, más preferentemente en una determinación diferencial de anticuerpos IgM, todavía más preferentemente en una determinación diferencial de anticuerpos IgM tempranos que se producen en una infección aguda y/o primaria. Los polipéptidos de fusión pueden portar grupos informadores y/o grupos de captura y de esta manera pueden utilizarse como antígenos de detección y/o de captura. Además, los polipéptidos de fusión también resultan adecuados como agentes de eliminación de interferencias.

Las moléculas de polipéptido de fusión de la presente invención preferentemente comprenden uno o dos dominios de multimerización, más preferentemente un dominio de multimerización. El dominio de multimerización preferentemente se localiza en el extremo N-terminal y/o C-terminal del polipéptido de fusión, más preferentemente en el extremo N-terminal. El dominio de multimerización es una secuencia polipeptídica que permite la multimerización de molécula individuales de polipéptido de fusión, en la que se forma un multímero que comprende una pluralidad de subunidades monoméricas, que se asocian mediante interacciones no covalentes. Las subunidades monoméricas del complejo son proteínas de fusión genética, en el que los residuos aminoácidos individuales se unen mediante enlaces peptídicos. Las subunidades monoméricas del multímero preferentemente son idénticas.

Por ejemplo, el dominio de multimerización puede ser un dominio de dimerización, es decir, un dominio que permite la asociación no covalente de dos subunidades; un dominio de trimerización, lo que permite la asociación no covalente de tres subunidades; un dominio de tetramerización o un dominio de multimerización de orden todavía más alto. Preferentemente, el dominio de multimerización es un dominio de dimerización, un dominio de trimerización o un dominio de tetramerización.

Los dominios de multimerización pueden seleccionarse de entre chaperones procarióticos o eucarióticos, preferentemente de entre chaperones independientes de ATP. Son ejemplos específicos de dominios de multimerización las proteínas FkpA, Skp y Sec de *E. coli* o los ortólogos de las mismas procedentes de otros organismos procarióticos. FkpA es un chaperón de dimerización periplásmico independiente de ATP de *E. coli*. Skp es un chaperón de trimerización periplásmico independiente de ATP de *E. coli*. SecB es un chaperón de tetramerización citosólico independiente de ATP de *E. coli*. Algunos dominios de multimerización adecuados adicionales son las proteínas de choque térmico de organismos eucarióticos o procarióticos, por ejemplo Hsp25, un chaperón oligomérico citosólico/nuclear eucariótico independiente de ATP. Un dominio de multimerización adecuado adicional es MIP (potenciador de infectividad de macrófagos), un chaperón de dimerización independiente de ATP estructuralmente relacionado con FkpA. Los chaperones dependientes de ATP, tales como GroEL, un chaperón de heptamerización citosólico dependiente de ATP de *E. coli*, ClpB, un chaperón de hexamerización dependiente de ATP de *E. coli*, o ClpX, también resultan adecuados. Además, los dominios de multimerización pueden seleccionarse de entre fragmentos o variantes de los polipéptidos anteriormente indicados que conserven su capacidad de formación de multímero.

El polipéptido de fusión de la invención comprende una pluralidad de copias de un segmento de epítipo. Un segmento de epítipo comprende una secuencia de aminoácidos reconocida por un anticuerpo. De esta manera, el polipéptido comprende múltiples sitios de unión para un anticuerpo que reconoce el epítipo respectivo. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de los segmentos de epítipo individuales es idéntica o sustancialmente idéntica. Sin embargo, resulta posible que uno o más de los segmentos de epítipo sean diferentes

con la condición de que estas diferencias no afecten negativamente al reconocimiento por parte de los anticuerpos que deben detectarse. El polipéptido de fusión comprende por lo menos 2, preferentemente 2 a 10, más preferentemente 2 a 6, y todavía más preferentemente 2, 3, 4, 5 ó 6 copias de los segmentos de epítipo.

5 Un multímero que consiste de una pluralidad de subunidades individuales de polipéptido de fusión preferentemente comprende por lo menos 4, más preferentemente por lo menos 6, y todavía más preferentemente por lo menos 8 copias de un segmento de epítipo. El multímero puede comprender, por ejemplo, hasta 40, preferentemente hasta 30, y todavía más preferentemente hasta 25 copias de un segmento de epítipo.

10 Habitualmente, el polipéptido de fusión comprende una pluralidad de copias de únicamente un solo segmento de epítipo. En este caso, el polipéptido de fusión presenta una única especificidad de anticuerpo. En algunas realizaciones, se contempla, sin embargo, que el polipéptido de fusión comprende una pluralidad de copias de dos o más segmentos de epítipo diferentes, preferentemente de dos segmentos de epítipo diferentes. En este caso, el polipéptido de fusión resulta adecuado para la detección de varios tipos de especificidad de anticuerpo.

15 La longitud de un segmento de epítipo habitualmente es de por lo menos 5 aminoácidos, preferentemente por lo menos 6 aminoácidos y más preferentemente por lo menos 8 aminoácidos. La longitud máxima del segmento de epítipo habitualmente es de entre 100 y 120 aminoácidos, preferentemente de 80 aminoácidos y más preferentemente de 70 aminoácidos. Más preferentemente, el segmento de epítipo presenta una longitud de entre
20 15 y 50 aminoácidos.

Los segmentos individuales de epítipo en el polipéptido de fusión pueden separarse con secuencias espaciadoras. Las secuencias de espaciador preferentemente son secuencias que son heterólogas respecto al organismo patógeno a partir del que se derivó el segmento de epítipo. A efectos prácticos, las secuencias de espaciador se
25 seleccionan de entre las secuencias que interfieren poco o nada con la utilización del polipéptido de fusión como antígeno de ensayo en la determinación de anticuerpos. Lo anterior implica que las secuencias de espaciador son reactivas no inmunológicamente contra los anticuerpos que deben someterse a ensayo. Preferentemente, las secuencias espaciadoras comprenden residuos de glicina y/o serina. Resultan especialmente preferentes las secuencias espaciadoras de poliglicina. La longitud de las secuencias espaciadoras preferentemente son de entre 1
30 y 10 aminoácidos, más preferentemente de entre 2 y 5 aminoácidos y todavía más preferentemente de 3 ó 4 aminoácidos. Resulta especialmente preferente una secuencia espaciadora (Gly)₃.

Además, puede encontrarse presente una secuencia espaciadora entre un dominio de multimerización y los segmentos de epítipo. Esta secuencia espaciadora puede presentar una longitud de, por ejemplo, 1 a 100
35 aminoácidos. Preferentemente, dicha secuencia espaciadora es heteróloga respecto al dominio de multimerización y al segmento de epítipo. Preferentemente, la secuencia espaciadora es tal como se ha indicado anteriormente.

Los segmentos de epítipo del polipéptido de fusión son secuencias de antígeno de un patógeno que son capaces de unirse a anticuerpos cultivados durante el curso de una reacción inmunológica por parte de un organismo infectado por el patógeno. Las secuencias de epítipo preferentemente se seleccionan con el fin de que resulten reconocidas por anticuerpos presentes en estadios específicos de la infección, por ejemplo epítipos "tempranos", que resultan preferentemente reconocidos por anticuerpos durante un estadio temprano de la infección, o epítipos "tardíos", que resultan preferentemente reconocidos en un estadio posterior de la infección. En una realización preferente, el segmento de epítipo comprende un epítipo que resulta específicamente reconocido por anticuerpos
40 presentes en una etapa temprana y/o aguda de una infección por dicho patógeno. En una realización especialmente preferente, el segmento de epítipo comprende un epítipo que resulta específicamente reconocido por anticuerpos presentes en una etapa temprana y/o aguda de una infección primaria por dicho patógeno. En una realización todavía adicional, el segmento de epítipo comprende un epítipo que resulta específicamente reconocido por anticuerpos presentes en una etapa tardía de una infección por dicho patógeno o en una infección pasada. En
50 todavía otra realización, el segmento de epítipo comprende un epítipo que resulta específicamente reconocido por anticuerpos presentes en una infección persistente o recurrente por dicho patógeno.

El segmento de epítipo puede derivarse a partir de cualquier patógeno vírico, bacteriano o protozoario, que resulte capaz de causar una reacción inmunológica detectable, es decir, una generación de anticuerpos, particularmente anticuerpos IgM, como resultado de una infección. Por ejemplo, el patógeno se selecciona de entre el grupo que
55 consiste de:

(i) virus herpes tales como los virus humanos del Herpes simplex de tipos 1 y 2 (HHV1 y HHV2), el virus de la varicela zóster (HHV3), el virus de Epstein-Barr (HHV4/EBV) o el citomegalovirus humano (HHV5) y los virus humanos del herpes de tipos 6, 7 y 8,

(ii) el virus de la rubéola,

(iii) los virus de la hepatitis, tales como el virus de la hepatitis A (HAV), el virus de la hepatitis B (HBV) y el virus de la hepatitis C (HCV),

(iv) paramixovirus tales como el virus del sarampión y el virus de la parotiditis,

(v) un organismo *Toxoplasma*, y

5 (vi) un organismo *Borrelia*.

Se han descrito ejemplos de epítomos adecuados de dichos patógenos en numerosos documentos, tal como se describe en detalle posteriormente. Dichos documentos y las referencias citadas en los mismos se incorporan como referencia en la presente memoria.

10 La detección específica de moléculas de IgM indicativa de una infección temprana resulta clínicamente importante para muchas infecciones víricas, bacterianas y protozoarias en el ser humano. La familia de los virus herpes, por ejemplo, comprende el virus del Herpes simplex de tipos 1 y 2 (HHV1 y HHV2), el virus de la varicela zóster (HHV3), el virus de Epstein-Barr (HHV4), el citomegalovirus humano (HHV5) y los virus herpes humanos de tipos 6, 7 y 8. El
15 citomegalovirus humano (HHV5) desempeña un papel clave en los diagnósticos rutinarios de embarazo. Puede provocar daños devastadores en el feto en el caso de que una mujer gestante sin inmunidad humoral o celular contra el virus contraiga una infección primaria durante el primer trimestre de la gestación.

20 Por medio del mapeado de epítomos, se ha identificado una pluralidad de determinantes inmunológicos cruciales en diferentes antígenos del herpes. Por ejemplo, las reactividades de anticuerpo de epítomos individuales en los antígenos del HCMV pp150, p52, gB y pp28 se resumen en Greijer *et al.*, J. Clin. Microbiol. 37(1):179-188, 1999. Se describen epítomos adicionales en Schoppel *et al.*, J. Infect. Dis. 175(3):533-544, 1997. Respecto al virus del Herpes simplex, se han localizado epítomos inmunodominantes en la secuencia 552 a 578 de la glucoproteína madura G del HSV-2 (Marsden *et al.*, J. Med. Virol. 56:79-84, 1998; Liljeqvist *et al.*, J. Gen. Virol. 79:1215-1224, 1998) y en la
25 secuencia 112 a 127 de la glucoproteína G1 del HSV-1 (Tunbäck *et al.*, J. Gen. Virol. 81:1033-1040, 2000), respectivamente. Dichos epítomos pueden incorporarse en los polipéptidos de fusión de la invención.

Toxoplasma gondii y el virus de la rubéola conjuntamente con el citomegalovirus humano y los virus del Herpes simplex de tipos 1 y 2 constituyen la familia TORCH y desempeñan papeles importantes como parámetros en los
30 exámenes de seguimiento del embarazo. Las infecciones primarias de mujeres gestantes (que no presentan inmunidad ni humoral ni celular) por dichos patógenos durante el primer trimestre de gestación puede conducir a daños severos en el feto. Ello requiere un diagnóstico diferencial fiable que discrimine entre las infecciones primarias y las recurrentes. Tal como se ha indicado anteriormente, los determinantes inmunodominantes dentro de varios antígenos del HCMV son bien conocidos de la literatura, por ejemplo las secuencias 595 a 636 y 1.011 a 1.048 de

35 pp150, las secuencias 266 a 293 y 295 a 312 de p52, las secuencias 792 a 809 y 60 a 81 de la glucoproteína B y las secuencias 15 a 45 y 130 a 160 de pp28 (Greijer *et al.*, *supra*). De manera similar, se han identificado epítomos en la proteína E1 inmunodominante de cubierta del virus de la rubéola. Por ejemplo, la región entre los aminoácidos 243 a 286 contiene tres epítomos neutralizadores, tal como informa Terry *et al.* (Terry *et al.*, Arch. Virol. 98:189-197, 1988).
40 Otro epítomo E1 neutralizador ha sido caracterizado en la región entre los aminoácidos 213 a 239 (Mitchell *et al.*, J. Clin. Microbiol. 30(7):1841-1847, 1992). Se ha identificado por lo menos un epítomo inmunodominante con capacidad neutralizante en una segunda proteína de cubierta del virus de la rubéola, E2 (Green y Dorsett, J. Virol. 57(3):893-898, 1986). Un epítomo inmunodominante de células T y varias epítomos lineales de células B han sido localizados en la región 31 a 105 de E2 (McCarthy *et al.*, J. Virol. 67(2):673-681, 1993; Wolinsky *et al.*, J. Virol. 65:3986-3994,
45 1991). Estos epítomos pueden incorporarse en los polipéptidos de fusión de la invención.

Se han identificado varias proteínas de *Toxoplasma gondii* como antígenos inmunodominantes: las proteínas de gránulos densos GRA1 (p24), GRA2 (p28), GRA4 (p41), GRA6 (p32), GRA7 (p29) y GRA8 (p35), los antígenos de superficie SAG1 (p30) y SAG2 (p22), los antígenos de roptry ROP1 (p66) y ROP2 (p54), la proteína de matriz
50 MAG1 (p65) y las proteínas de micronema MIC3 y MIC5 (Pfrepper *et al.*, Clin. Diagn. Lamb. Immunol. 12(8):977-982, 2005). Para la detección de los anticuerpos IgM anti-toxoplasma, se ha sugerido anteriormente una combinación de GRA7, GRA8 y ROP1 (Aubert *et al.*, J. Clin. Microbiol. 38:1144-1150, 2000). 1144-1150). Dichos epítomos pueden incorporarse en los polipéptidos de fusión de la invención.

55 Otro campo importante de la serología cubre los virus de la hepatitis, tales como HAV, HBV y HCV. Los antígenos inmunodominantes y los epítomos inmunodominantes respectivos son bien conocidos para cada uno de dichos patógenos. Por ejemplo, la proteína de nucleocápside del HBV es la diana principal de la respuesta inmunológica del huésped en la hepatitis B crónica, y se han caracterizado varios epítomos inmunodominantes. Los epítomos de células B importantes del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) han sido localizados en los aminoácidos
60 74 a 89, 130 a 138 (Salfeld *et al.*, J. Virol. 63:798-808, 1989, y 107 a 118 (Colucci *et al.*, J. Immunol. 141:4376-4380, 1988). Dichos epítomos pueden incorporarse en los polipéptidos de fusión de la invención.

Los epítomos inmunodominantes han sido caracterizados para una pluralidad de antígenos de la hepatitis C (resumidos en Calos *et al.*, Clin. Immunol. 111:22-27, 2004). Por ejemplo, los epítomos de las regiones
65 inmunodominantes de Core (7 a 18), E2 (484 a 499), NS3 (1.248 a 1.265) y NS4 (1.767 a 1.786) han sido definidos, así como los epítomos de las regiones hipervariables de E2 del HVR1 de genotipo 1a (386 a 406), de E2 del HVR2

de genotipo 1a (472 a 485), de E2 del HVR1 de genotipo 1b (386 a 406) y de E2 del HVR2 de genotipo 1b (472 a 485). Dichos epítomos y otros epítomos de HCV pueden incorporarse en los polipéptidos de fusión de la invención y seguramente demostrarán ser útiles en el desarrollo de un inmunoensayo diferencial de IgM según la presente invención.

Otros patógenos humanos importantes son el virus del sarampión y el virus de la parotiditis, ambos pertenecientes a la familia de los paramixovirus y consistentes cada uno de seis proteínas estructurales. La proteína N de nucleocápside del virus del sarampión es la diana principal de la respuesta inmunológica humoral, y la respuesta de las células B contra N resulta crucial en el control de la infección del sarampión. Recientemente, los epítomos inmunodominantes han sido localizados dentro del extremo C-terminal del antígeno N entre los aminoácidos 419 y 525. En particular, ha podido localizarse un epítipo lineal dentro de una secuencia de 440 a 448 (Zvirbliene *et al.*, Arch. Virol. 152:25-39, 2007). De manera similar, la proteína NP asociada a la nucleocápside del virus de la parotiditis constituye el determinante antigénico principal, y las variantes recombinantes de NP muestran una elevada antigenicidad y son muy adecuados para la detección específica de IgM en la serología de la parotiditis (Samuel *et al.*, J. Med. Virol. 66:123-130, 2002).

El inmunodiagnóstico de *Borrelia* (*B. burgdorferi*, *B. garinii* y *B. afzelii*) ha despertado un interés creciente debido a la imparable expansión de esta espiroqueta. Debido a los inviernos suaves que se esperan con el cambio climático, se cree que el impacto de *Borrelia* se incrementará todavía más en el futuro cercano. Se ha descrito una región conservada inmunodominante del antígeno VisE de *Borrelia burgdorferi* que resulta muy adecuada para el serodiagnóstico sensible y específico (Liang *et al.*, J. Clin. Microbiol. 37(12):3990-3936, 1999). La región denominada IR6 ó C6 (Liang y Philipp, Infect. Immun. 67:6702-6706, 1999; Liang *et al.*, J. Immunol. 163(10):5566-5573, 1999) comprende un segmento invariable de 26 aminoácidos que puede incorporarse en los polipéptidos de fusión de la invención.

El polipéptido de fusión preferentemente se utiliza como reactivo de ensayo en un método para detectar un anticuerpo, particularmente un anticuerpo IgM en una muestra. Con este fin, la proteína de fusión puede portar grupos informadores y/o de acoplamiento. Son ejemplos de grupos informadores adecuados, grupos detectables por medios ópticos, por ejemplo grupos fluorescentes, grupos luminiscentes, por ejemplo grupos quimioluminiscentes, o grupos particulados, tales como partículas de metal, por ejemplo de oro, o partículas de látex. Evidentemente también se encuentran disponibles grupos informadores adecuados, tales como grupos enzimáticos, grupos radioactivos, grupos haptenos, etc. Son especialmente preferentes los grupos informadores de electroquimioluminiscencia, particularmente grupos de rutenio, tales como los grupos (bipiridina)₃ de rutenio o (fenantrolina)₃ de rutenio. También resultan especialmente preferentes los grupo informadores hapteno tales como grupos digoxigenina que pueden detectarse con un anticuerpo anti-hapteno, tal como un anticuerpo anti-digoxigenina. En una realización adicional, el polipéptido de fusión puede portar por lo menos un grupo de acoplamiento. Un grupo de acoplamiento es un grupo para el acoplamiento del polipéptido de fusión con un compuesto o sustancial adicional, por ejemplo una fase sólida o un grupo informador tal como se ha definido anteriormente. El grupo de acoplamiento puede ser un grupo para el acoplamiento covalente o para el acoplamiento no covalente. Preferentemente, el grupo de acoplamiento es una primera pareja de una pareja de unión específica, que interactúa específicamente con la segunda pareja de la pareja de unión. Las parejas de unión preferentes son biotina/avidina, biotina/estreptavidina, biotina/anticuerpo antibiotina, hapteno/anticuerpo antihapteno y carbohidrato/lectina. Preferentemente, el grupo de acoplamiento es un grupo biotina que incluye derivados de biotina, es decir, compuestos relacionados estructuralmente con biotina que conservan la capacidad de unirse a estreptavidina y/o a avidina.

El polipéptido de fusión puede unirse a grupos informadores y/o de acoplamiento según medios convencionales. Por ejemplo, pueden prepararse reactivos de conjugación que comprenden grupos informadores y/o de acoplamiento. Estos reactivos pueden comprender además un grupo que puede reaccionar con grupos presentes en el polipéptido, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, carboxi y/o tio. Son ejemplos específicos de grupos de acoplamiento los grupos éster activos, por ejemplo grupos N-hidroxisuccinimida o grupos maleimida.

La invención se refiere además a una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido de fusión tal como se ha indicado anteriormente. La molécula de ácidos nucleicos preferentemente es una molécula de ADN. Con el fin de incrementar la estabilidad de la molécula de ácidos nucleicos, resulta preferente que las partes de la misma codificantes de los segmentos individuales de epítipo (que preferentemente son idénticos a nivel de aminoácidos) presenten una secuencia de nucleótidos diferente dentro del alcance de la degeneración del código genético, en los que se utilizan diferentes codones tripletes de nucleótidos codificantes de los mismos aminoácidos. Más preferentemente, cada parte codificante de un segmento individual de epítipo idéntico presenta una secuencia de nucleótidos que es diferente de las demás partes.

Además, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende por lo menos una molécula de ácidos nucleicos tal como se ha indicado anteriormente operablemente ligada a una secuencia de control de la expresión. El vector de expresión puede ser un vector procariótico o eucariótico que comprenda además elementos genéticos para el mantenimiento y la propagación en la célula huésped respectiva, tal como un origen de replicación y/o genes marcadores de selección. La secuencia de control de la expresión puede ser una secuencia de control de la

expresión procariótica o eucariótica que sea constitutiva o inducible. La secuencia de control de la expresión se selecciona para permitir la expresión eficiente en una célula huésped deseada. Los ejemplos de vectores de expresión y secuencias de control de la expresión adecuados son conocidos por el experto en la materia y se describen en libros de texto estándares, tales como Sambrook *et al.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press, 1989, o se encuentran disponibles comercialmente. Además, la invención se refiere a una célula huésped transfectada o transformada con una molécula de ácidos nucleicos o un vector de expresión tal como se ha indicado anteriormente. La célula huésped puede ser una célula procariótica, por ejemplo una célula bacteriana Gram-negativa tal como *E. coli*, o una célula eucariótica, por ejemplo una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de mamífero. La célula huésped puede utilizarse para la preparación recombinante de un polipéptido de fusión tal como se ha indicado anteriormente. Preferentemente, la producción recombinante comprende las etapas siguientes:

(i) proporcionar una célula huésped tal como se ha indicado anteriormente,

(ii) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones en las que se exprese el polipéptido de fusión, y

(iii) aislar dicho polipéptido de fusión.

Tal como se ha indicado anteriormente, el polipéptido de fusión de la presente invención preferentemente se utiliza como reactivo de detección en un método para detectar un anticuerpo en una muestra. El anticuerpo preferentemente es un anticuerpo IgM. Más preferentemente, la detección comprende una determinación diferencial de anticuerpos IgM. En una realización especialmente preferente, el anticuerpo es un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana o aguda de una infección, particularmente de una infección primaria por un patógeno.

En una realización adicional, el polipéptido de fusión puede utilizarse como reactivo de eliminación de interferencias en un método para detectar un anticuerpo en una muestra. En la presente realización, el anticuerpo preferentemente es un anticuerpo IgG.

La invención también se refiere a un kit de reactivos de ensayo para detectar un anticuerpo en una muestra, que comprende por lo menos un polipéptido de fusión y componentes de ensayo adicionales. El reactivo de ensayo puede comprender un único polipéptido de fusión que comprende un único tipo de epítomos, o un único polipéptido de fusión que comprende dos o más tipos diferentes de epítomo, o dos o más polipéptidos de fusión que comprenden un único tipo de epítomo o dos o más tipos diferentes de epítomo. El polipéptido de fusión de la invención puede ser un reactivo de detección o un reactivo de eliminación de interferencias. En el caso de que el polipéptido de fusión sea un reactivo de detección, preferentemente comprende grupos informadores y/o de acoplamiento tal como se ha indicado anteriormente. En el caso de que el polipéptido de fusión sea un reactivo de eliminación de interferencias, preferentemente no comprende ningún grupo informador. El reactivo de eliminación de interferencias se caracteriza porque su concentración o densidad efectiva de epítomos difiere de la concentración efectiva de epítomos del reactivo de detección. Preferentemente, la concentración de epítomos o la densidad de epítomos del reactivo de eliminación de interferencias es más baja que la del reactivo de detección.

La presente invención también se refiere a un método para detectar un anticuerpo dirigido contra un organismo patógeno en una muestra que comprende las etapas siguientes:

(a) incubar dicha muestra con un reactivo de ensayo que comprende por lo menos un polipéptido de fusión tal como se ha indicado anteriormente y componentes de ensayo adicionales, y

(b) determinar la presencia y/o concentración de dicho anticuerpo en dicha muestra mediante la evaluación de la reacción de los componentes de la muestra con el reactivo de ensayo.

El reactivo de ensayo preferentemente comprende un reactivo de detección y por lo menos un reactivo de eliminación de interferencias, y la etapa (b) comprende determinar la reacción de componentes deseados de la muestra, es decir, el tipo de anticuerpo que debe detectarse, con el reactivo de detección, en el que los componentes no deseados de la muestra, por ejemplo anticuerpos de una clase diferente, tal como anticuerpos IgG y/o IgM característicos de estadios de la infección no relevantes, se capturan con el reactivo o reactivos de eliminación de interferencias. En una realización preferente, el anticuerpo que debe detectarse es un anticuerpo IgM, más preferentemente un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana y/o aguda de una infección, particularmente de una infección primaria. En este caso, el reactivo de ensayo preferentemente comprende además un reactivo de eliminación de interferencias para capturar los anticuerpos IgG y/o un reactivo de eliminación de interferencias para capturar los anticuerpos IgM presentes en una etapa tardía de una infección y/o en una infección recurrente, en el que el reactivo de eliminación de interferencias no porta un grupo informador. El reactivo de eliminación de interferencias se caracteriza porque su concentración o densidad efectiva de epítomos difiere de la concentración o densidad efectiva de epítomos del reactivo de detección. En el caso de que el reactivo de detección se proporcione para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana y/o aguda de una infección, la concentración o densidad efectiva de epítomos del reactivo de eliminación de interferencias es más baja. Por ejemplo, la concentración o densidad de epítomos del reactivo de eliminación de interferencias no debería

exceder el cincuenta por ciento de la densidad de epítomos del reactivo de detección.

Preferentemente, la muestra se preincuba con el reactivo o reactivos de eliminación de interferencias antes de ponerlos en contacto con el reactivo de detección.

Son ejemplos de reactivos de eliminación de interferencias con IgG, los antígenos que comprenden fragmentos que comprenden epítomos monoméricos. En una realización preferente, los reactivos de eliminación de interferencias de IgG son polipéptidos de fusión que comprenden un dominio chaperón monomérico, tal como SlyD de *E. coli*, y una única copia de un fragmento que comprende epítomos procedentes del patógeno. El epítomo presente en el reactivo de eliminación de interferencias de IgG puede ser igual al presente en el reactivo de detección.

Son ejemplos de reactivos de eliminación de interferencias para capturar, y de esta manera inactivar, anticuerpos IgM tardíos, los antígenos multiméricos que comprenden una pluralidad de epítomos. En la presente realización, el reactivo de eliminación de interferencias, sin embargo, comprende un número inferior de epítomos que el reactivo de detección. Preferentemente, el reactivo de eliminación de interferencias comprende por lo menos dos epítomos y hasta la mitad del número de epítomos del reactivo de detección respectivo. Inesperadamente se ha encontrado que dicho reactivo multimérico de eliminación de interferencias es capaz de capturar, y de esta manera inactivar los anticuerpos IgM tardíos, que se encontró que presentaban una afinidad más alta respecto al epítomo que los anticuerpos tempranos que debían detectarse sin presentar un efecto negativo significativo sobre la detección de los anticuerpos IgM tempranos deseados. De esta manera, por ejemplo, el reactivo de eliminación de interferencias de IgM comprende 2 a 6, por ejemplo 2, 3, 4 ó 6 copias del epítomo, mientras que un reactivo de detección de IgM temprana puede comprender por lo menos 8, por ejemplo por lo menos 12 ó 16 copias del fragmento que comprende el epítomo. El agente de eliminación de interferencias puede ser, por ejemplo, un polipéptido de fusión que comprende un dominio chaperón monomérico, tal como SlyD, y una pluralidad de epítomos, o un polipéptido de fusión que comprenda un dominio de multimerización y un único epítomo ó 2 copias del epítomo. El epítomo presente en el reactivo de eliminación de interferencias de IgG preferentemente puede ser igual al presente en el reactivo de detección.

El método de la invención preferentemente se lleva a cabo en forma de ensayo de doble antígeno de tipo sándwich, en el que el reactivo de ensayo comprende dos polipéptidos de fusión tal como se ha indicado anteriormente, en el que el primer polipéptido de fusión porta un grupo informador o porta un grupo de acoplamiento que puede unirse a un grupo informador. El segundo polipéptido de fusión se une a una fase sólida o porta un grupo de acoplamiento para la inmovilización en una fase sólida. En la presente realización, el analito anticuerpo se determina a partir de la formación de un complejo con el primer y segundo polipéptidos de fusión y la detección de dicho complejo en dicha fase sólida.

En una realización preferente adicional, el método de la invención puede llevarse a cabo en forma de un ensayo indirecto, en el que el reactivo de ensayo comprende un polipéptido de fusión, que porta un grupo de acoplamiento para la inmovilización en una fase sólida y un receptor que reconoce la clase de anticuerpo que debe determinarse, por ejemplo un anticuerpo anti-IgM humano, en el que el receptor porta un grupo informador y en el que el anticuerpo se determina mediante la formación de un complejo con el polipéptido de fusión y el receptor en una fase sólida. Alternativamente, el ensayo indirecto puede comprender la utilización de un receptor inmovilizado o inmovilizable y un polipéptido de fusión que comprende un grupo informador.

Tal como se ha explicado anteriormente, la presente invención permite el diagnóstico diferencial de los anticuerpos IgM. De esta manera, una realización adicional se refiere a una determinación específica de anticuerpos IgM que se produce en una etapa tardía de una infección y/o en una infección recurrente. En la presente realización, el reactivo de detección comprende por lo menos un antígeno multimérico que presenta una densidad de epítomos reducida tal como se ha indicado anteriormente, por ejemplo preferentemente un polipéptido de fusión que comprende 2 a 6, por ejemplo 2, 3, 4 ó 6 copias del epítomo, que puede resultar adecuado como reactivo de eliminación de interferencias en un ensayo para anticuerpos IgM "tempranos", pero que porta un grupo informador y/o de acoplamiento. Además, el ensayo preferentemente comprende un reactivo de eliminación de interferencias para capturar anticuerpos IgG tal como se ha indicado anteriormente y/o un reactivo de eliminación de interferencias para capturar anticuerpos IgM presentes en una etapa temprana de una infección, particularmente en una etapa temprana de una infección primaria y/o aguda. Preferentemente, el reactivo de eliminación de interferencias para los anticuerpos IgM "tempranos" corresponde al reactivo de ensayo para determinar anticuerpos IgM "tempranos" aunque sin grupos informadores. Alternativamente, una determinación diferencial de IgM puede llevarse a cabo mediante análisis diferencial, es decir un primer ensayo en presencia de un reactivo de ensayo para detectar únicamente un tipo de anticuerpos IgM (por ejemplo anticuerpos "tempranos") y un segundo ensayo con un reactivo de ensayo para detectar la totalidad de los anticuerpos IgM.

En todavía una realización adicional, el anticuerpo que debe detectarse es un anticuerpo IgG. En este caso, el reactivo de detección es un antígeno monomérico, por ejemplo una proteína de fusión monomérica tal como se ha indicado anteriormente. Además, el reactivo de ensayo comprende un reactivo de eliminación de interferencias para capturar anticuerpos IgM, que es un antígeno multimérico que comprende un complejo de polipéptidos de fusión de la presente invención tal como se ha indicado anteriormente, en el que cada polipéptido de fusión comprende un

dominio de multimerización y una pluralidad de copias de un epítipo. El reactivo de eliminación de interferencias preferentemente no contiene un grupo informador.

- 5 La solicitud da a conocer además un método para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM en una muestra, en el que la muestra puede comprender un anticuerpo interferente seleccionado de entre un anticuerpo IgM interferente y/o un anticuerpo IgG interferente. Según dicho método, se utiliza un reactivo de ensayo que comprende un antígeno múltiple, es decir, un antígeno que comprende una pluralidad de copias de epítipo a la que puede unirse el anticuerpo que debe detectarse. Preferentemente, el antígeno de ensayo comprende un grupo informador.
- 10 El método de la invención se basa en la utilización de un antígeno de ensayo multimérico con una densidad y/o concentración efectiva de epítipos preseleccionada adaptada al tipo de anticuerpo IgM que debe detectarse. El antígeno de ensayo preferentemente se combina con un reactivo de eliminación de interferencias adaptado para eliminar la unión de los tipos de anticuerpo IgM no deseados al antígeno de ensayo.
- 15 La densidad o concentración efectiva de epítipos del antígeno de ensayo se adapta para el tipo de anticuerpo IgM que debe detectarse, por ejemplo un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana o aguda de una infección, preferentemente de una infección primaria o, alternativamente, un anticuerpo IgM presente en una etapa tardía de una infección, un anticuerpo IgM presente en una infección pasada y/o un anticuerpo IgM presente en una infección persistente o recurrente. Preferentemente, la detección diferencial del anticuerpo IgM se lleva a cabo en presencia de por lo menos un reactivo de eliminación de interferencias, que puede comprender un antígeno que se une específicamente a un anticuerpo IgM interferente y/o un antígeno que se une específicamente a un anticuerpo IgG interferente. Un aspecto adicional de la invención se refiere, de esta manera, a un método para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM dirigido contra un patógeno en una muestra, en la que la muestra puede comprender un anticuerpo interferente seleccionado de entre un anticuerpo IgM interferente y/o un anticuerpo IgM interferente, comprendiendo las etapas siguientes:
- 20
- 25

(a) incubar dicha muestra con un reactivo de ensayo, que comprende:

- 30 (i) por lo menos un receptor R^1 que se une específicamente a anticuerpos IgM, en el que R^1 es un antígeno multimérico o un anticuerpo anti-IgM humana,
- (ii) por lo menos un receptor R^2 , que se une específicamente al anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente, en el que R^2 es un polipéptido de fusión tal como se ha indicado en la presente memoria y porta un grupo informador,
- 35 (iii) opcionalmente por lo menos un receptor R^3 , que se une específicamente al anticuerpo IgM interferente, en el que R^3 es un antígeno multimérico y presenta una densidad o concentración efectiva de epítipos que es por lo menos dos veces inferior a la densidad o concentración de epítipos del receptor R^2 , y
- 40 (iv) opcionalmente un receptor R^4 que se une específicamente a un anticuerpo IgM, en el que R^4 es un antígeno monomérico que comprende una única copia de epítipo,

(b) permitiendo que se formen los complejos siguientes:

- 45 (i) un complejo que comprende R^1 , dicho anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente y R^2 , portando dicho complejo un grupo informador,
- (ii) opcionalmente un complejo que comprende R^3 y dicho anticuerpo IgM interferente, eliminando de esta manera la unión interferente de dicho anticuerpo IgM interferente a R^2 ,
- 50 (iii) opcionalmente un complejo que comprende R^4 y dicho anticuerpo IgG interferente, eliminando de esta manera la unión interferente de dicho anticuerpo IgG interferente a R^2 ,
- 55 (c) determinar dicho grupo informador unido con R^2 a dicho anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente a modo de medida de dicho anticuerpo IgM en dicha muestra.

El ensayo puede llevarse a cabo en un formato de ensayo de doble antígeno de tipo sándwich o en un formato indirecto tal como se ha indicado anteriormente. En un formato de doble antígeno de tipo sándwich, el receptor R^1 es un antígeno multimérico que se une específicamente al anticuerpo IgM que debe detectarse. En un formato de ensayo indirecto, el receptor R^1 es un receptor que se une específicamente a cualquier IgM, particularmente a cualquier IgM humana en la muestra, por ejemplo un anticuerpo anti-IgM humana. La unión del tipo de anticuerpo IgM deseado preferentemente se detecta en una fase sólida. Con este fin, el receptor R^1 preferentemente porta un grupo de acoplamiento para la inmovilización en una fase sólida, por ejemplo un grupo de acoplamiento tal como se ha indicado anteriormente, preferentemente biotina. El grupo informador del receptor R^2 marcado es un grupo informador tal como se ha indicado anteriormente, preferentemente un grupo electroquimioluminiscente. Al utilizar

60

65

reactivos de eliminación de interferencias, es decir, los receptores R^3 y/o R^4 , preferentemente se preincubaron con la muestra antes de añadir los receptores R^1 y/o R^2 .

El receptor R^4 de eliminación de interferencias de IgG es un receptor monomérico, es decir, un antígeno que comprende una única copia de epítipo. El receptor de ensayo R^2 y el receptor R^3 de eliminación de interferencias de IgM son receptores multiméricos, es decir, antígenos que comprenden múltiples copias de epítipo. Sin embargo, R^2 y R^3 presentan diferentes densidades o concentraciones efectivas de epítipos y de esta manera se unen preferentemente a tipos diferentes de anticuerpos IgM. Para la determinación diferencial de los anticuerpos IgM presentes en una etapa temprana o aguda de una infección, preferentemente de una infección primaria, el receptor R^2 marcado puede comprender, por ejemplo, por lo menos 6, preferentemente por lo menos 8, y más preferentemente por lo menos 12 copias de epítipo, hasta 40, preferentemente hasta 30, y más preferentemente hasta 25 copias de epítipo reconocidas por el anticuerpo IgM que debe detectarse. El receptor R^3 de eliminación de interferencias, que es específico de los anticuerpos IgM "tardíos" presenta una densidad o concentración efectiva de epítipos que es por lo menos dos veces más baja, preferentemente por lo menos tres veces más baja, y más preferentemente por lo menos 4 veces más baja e incluso más baja, que la densidad o concentración de epítipos del receptor de ensayo R^2 . En la presente realización, el receptor R^3 de eliminación de interferencias puede comprender 2 a 8, preferentemente 3 a 6, copias de epítipos.

El receptor de ensayo multimérico R^2 es un polipéptido de fusión tal como se ha indicado anteriormente para el primer aspecto de la invención. El receptor R^3 de eliminación de interferencias multimérico también puede ser un polipéptido de fusión tal como se ha indicado anteriormente. Sin embargo, debe indicarse que en la presente realización de la invención, también pueden utilizarse antígenos de ensayo multiméricos convencionales, por ejemplo antígenos multiméricos obtenidos mediante entrecruzamiento químico de antígenos o epítipos monoméricos por parte de entrecruzantes homobifuncionales o heterobifuncionales. Alternativamente, los antígenos multiméricos pueden ser moléculas portadoras, por ejemplo polipéptidos portadores con secuencias peptídicas de epítipo acopladas a los mismos o péptidos multiméricos, por ejemplo péptidos multiméricos ramificados tal como se describe en Lee *et al.*, Nature Biotechnology 23:1517-1526, 2005, el contenido de la cual se incorpora como referencia en la presente memoria.

Todavía un aspecto adicional de la invención se refiere a un reactivo de ensayo para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM dirigido contra un patógeno en una muestra, en la que la muestra puede comprender un anticuerpo interfiriente seleccionado de entre un anticuerpo IgM interfiriente y/o un anticuerpo IgG interfiriente, comprendiendo:

(i) por lo menos un receptor R^1 que se une específicamente a anticuerpos IgM, en el que R^1 es un antígeno multimérico o un anticuerpo anti-IgM humana,

(ii) por lo menos un receptor R^2 , que se une específicamente al anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente, en el que R^2 es un polipéptido de fusión tal como se ha indicado en la presente memoria y porta un grupo informador,

(iii) opcionalmente por lo menos un receptor R^3 , que se une específicamente al anticuerpo IgM interfiriente, y

(iv) opcionalmente un receptor R^4 que se une específicamente a un anticuerpo IgG,

La presente invención se explica adicionalmente mediante las figuras y los ejemplos, posteriormente.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Purificación de Skp-p52-X4 tal como se documenta mediante SDS-PAGE. Carril 1, estándar de proteínas Mark 12 no teñido de Invitrogen; carril 3, lisado crudo caotrópico de la cepa sobreproductora *E. coli* BL21/DE 3; carril 5, eluido de IMAC; carril 6, fracción de lavado con imidazol; carril 8, fracción de elución con imidazol; carril 9, Skp-p52-X4 tras la filtración en gel (Superdex 200). Skp-p52-X4 puede purificarse y plegarse nuevamente con altos rendimientos en el protocolo simple de una etapa descrito en los Métodos.

Figura 2A-I: Secuencias de aminoácidos (ver el Listado de secuencias).

Listado de secuencias

SEC ID nº 1 Secuencia de aminoácidos de SlyD (AA 1 a 165)
 SEC ID nº 2 Secuencia de aminoácidos de FkpA (AA 26 a 270)
 SEC ID nº 3 Secuencia de aminoácidos de Skp (AA 21 a 161)
 SEC ID nº 4 Secuencia de aminoácidos de Skp-ppUL32-X1 (ppUL32= HCMV pp150, AA 587 a 640)
 SEC ID nº 5 Secuencia de aminoácidos de Skp-ppUL32-X4
 SEC ID nº 6 Secuencia de aminoácidos de Skp-pp150-X1 (pp150= HCMV pp150, AA 999 a 1.048)
 SEC ID nº 7 Secuencia de aminoácidos de Skp-pp150-X4
 SEC ID nº 8 Secuencia de aminoácidos de Skp-pp150-X1 (p52= HCMV pp52, AA 254 a 293)

SEC ID nº 9 Secuencia de aminoácidos de Skp-p52, AA 254 a 293

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de reactivos de ensayo de polipéptido de fusión

1. Materiales y métodos

1.1. Materiales y reactivos

Se obtuvo el Cl de guanidinio (GdmCl) de NIGU (Waldkraiburg, Alemania). Las tabletas de inhibidor de proteasa sin EDTA Complete®, imidazol y EDTA se obtuvieron de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania); todos los demás compuestos químicos eran de grado analítico, de Merck (Darmstadt, Alemania). Las membranas de ultrafiltración (YM10, YM30) se obtuvieron de Amicon (Danvers, MA, USA); las membranas de microdiálisis (VS/0,025 µm) y las unidades de ultrafiltración (dispositivos de filtración Ultrafree Biomax) se obtuvieron de Millipore (Bedford, MA, USA). Las membranas de nitrato de celulosa y de acetato de celulosa (1,2 µm/0,45 µm/0,2 µm) para la filtración de los lisados crudos se obtuvieron de Sartorius (Göttingen, Alemania).

1.2 Clonación de casetes de expresión

Las secuencias de Skp, FkpA y SlyD se obtuvieron de la base de datos SwissProt (UniProt) (Skp: SwissProt nº de acceso P11457; FkpA: SwissProt nº de acceso P45523; SlyD: SwissProt nº de acceso POA9K9). Los genes de Skp, FkpA y SlyD de *E. coli* se amplificaron mediante PCR a partir de la cepa *E. coli* B21 (DE3), cortada y ligada en el vector de expresión pET24a (Novagen, Madison, Wisconsin, USA). Con el fin de evitar la formación de compuestos covalentes mediante puentes disulfuro, se eliminó la parte C-terminal rica en cisteínas de SlyD (166-196) y la versión truncada de SlyD AA 1 a 165 (SEC ID nº 1) se utilizó como pareja de fusión. Con el fin de garantizar la expresión citosólica de las moléculas diana, se omitieron las secuencias de señal de los chaperones periplásmicos FkpA y Skp. De esta manera, la versión AA 26 a 270 de FkpA (SEC ID nº 2) y la versión AA 21 a 161 de Skp (SEC ID nº 3) se utilizaron como módulos en los polipéptidos de fusión. Los casetes de expresión para las proteínas de fusión se diseñaron tal como se describe en Scholz *et al.* (J. Mol. Biol. 345:1229-1241, 2005). Se utilizaron técnicas de QuikChange (Stratagene, La Jolla, USA) y de PCR estándares para generar mutaciones puntuales, variantes por delección e inserción o sitios de restricción. Todas las variantes de proteína recombinante contenían una etiqueta hexahistidina C-terminal para facilitar la purificación asistida por Ni-NTA y el replegamiento.

1.3 Expresión, purificación y replegamiento de variantes de proteína de fusión

Se purificaron todas las variantes de polipéptido de fusión mediante la utilización de protocolos virtualmente idénticos. Se cultivaron a 37°C en medio LB más canamicina (30 µg/ml) células de *E. coli* BL21 (DE3) que contenían el plásmido de expresión pET24a particular, hasta una DO₆₀₀ de 1,5, y se indujo la sobreexpresión citosólica mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactósido 1 mM. Tres horas después de la inducción se recolectaron las células mediante centrifugación (20 minutos a 5.000g), se congelaron y se almacenaron a -20°C. Para la lisis celular, el pellet congelado se resuspendió en fosfato sódico 50 mM frío, pH 8,0, GdmCl 7,0 M e imidazol 5 mM, y la suspensión se agitó durante 2 horas sobre hielo para completar la lisis celular. Tras la centrifugación y filtración (membrana de nitrato de celulosa, 0,45 µm/0,2 µm), el lisado se aplicó sobre una columna de Ni-NTA equilibrada con el tampón de lisis que incluía TCEP 5,0 mM (tris(2-carboxietil)fosfina). La etapa de lavado posterior se adaptó para la proteína diana respectiva y presentaba imidazol 10-25 mM (proteínas de fusión SlyD y FkpA) a imidazol 30 mM (proteínas de fusión Skp) en fosfato sódico 50 mM, pH 8,0, GdmCl 7,0 M y TCEP 5,0 mM. Se aplicaron por lo menos 10 a 15 volúmenes del tampón de lavado. A continuación, se sustituyó la solución de GdmCl por fosfato sódico 50 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM, TCEP 5,0 mM, para inducir el replegamiento conformacional de la proteína unida a matriz. Con el fin de evitar la reactivación de las proteasas copurificadas, se incluyó un cóctel de inhibidor de proteasa (sin EDTA, Complete®, Roche) en el tampón de replegamiento. Se aplicó un total de 15 a 20 volúmenes de columna de tampón de replegamiento en una reacción durante la noche. A continuación, se eliminó tanto TCEP como el cóctel de inhibidor sin EDTA Complete® mediante lavado con 3 a 5 volúmenes de columna de fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, NaCl 100 mM e imidazol 40 mM. A continuación, se eluyó la proteína nativa con imidazol 250 mM en el mismo tampón. Se evaluaron las fracciones que contenían proteínas para su pureza mediante SDS-PAGE-tricina tal como describen Schagger y von Jagow (Anal. Biochem. 166:368-379, 1987) y se agruparon. Finalmente, las proteínas se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex HiLoad, Amersham Pharmacia) y se agruparon y se concentraron las fracciones que contenían proteínas en una celda Amicon (YM10).

Se produjeron los polipéptidos de fusión Skp siguientes: Skp-ppUL32-X1 (SEC ID nº 4) y Skp-ppUL32-X4 (SEC ID nº 5)

Dichos polipéptidos de fusión comprendían el módulo de fusión de Skp y una (X1) o cuatro (X4) copias del epítipo ppUL32 de citomegalovirus humano (HCMV). Este epítipo corresponde a los aminoácidos 587 a 640 de la

fosfoproteína estructural grande pp150 de HCMV (Uniprot ID P08318). Skp-pp150-X1 (SEC ID nº 6) y Skp-pp150-X4 (SEC ID nº 7)

Dichos polipéptidos de fusión comprenden el módulo de fusión de Skp y una (X1) o cuatro (X4) copias del epítipo pp150 del HCMV, que corresponde a los aminoácidos 999 a 1.048 de pp150 del HCMV. Skp-pp52-X1 (SEC ID nº 8) y Skp-pp52-X4 (SEC ID nº 9)

Dichos polipéptidos de fusión comprenden el módulo de fusión de Skp y una (X1) o cuatro (X4) copias del epítipo p52 del HCMV, que corresponde a los aminoácidos 254 a 293 de la proteína accesoria de polimerasa p52 del HCMV (Uniprot ID P16790).

1.4 Mediciones espectroscópicas

Se llevaron a cabo mediciones de la concentración de proteínas con un espectrofotómetro de doble haz Uvikon XL. Se determinaron los coeficientes de extinción molar (ϵ_{280}) mediante la utilización del procedimiento descrito por Pace *et al.* (Protein Sci. 4:2411-2423, 1995).

1.5 Acoplamiento de fracciones de rutenio a las proteínas de fusión

Se modificaron los grupos ϵ -amino de lisina de las proteínas de fusión a concentraciones de proteína de - 10 mg/ml con marcajes de rutenio activados con N-hidroxi-succinimida. La proporción molar de marcaje:proteína variaba entre 2:1 y 7:1, dependiendo de la proteína de fusión respectiva. El tampón de reacción era fosfato potásico 150 mM (pH 8,0), cloruro potásico 50 mM, EDTA 1 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 10 minutos y se detuvo mediante la adición de L-lisina tamponada a una concentración final de 10 mM. Para evitar la inactivación hidrolítica de los marcajes, se prepararon las soluciones madre respectivas en DMSO seco (calidad Seccosolv, Merck, Alemania). Las concentraciones de DMSO de hasta 20% en el tampón de reacción resultan bien toleradas por todas las proteínas de fusión estudiadas. Tras la reacción de acoplamiento, se eliminó el marcaje libre no reaccionado y el solvente orgánico mediante pase del conjugado de proteína cruda por una columna de filtración en gel (Superdex 200 HiLoad).

1.6 Reactividad inmunológica de proteínas de fusión chaperones

Los módulos de fusión chaperones se utilizaron para detectar los anticuerpos IgM dirigidos contra los antígenos p52 y pp150 de HCMV, que se encuentran presentes en abundancia en suero humano al inicio de la infección por CMV. Se retó la reactividad inmunológica en un analizador automático Elecsys® 2010 utilizando el formato P-Capture (es decir, la colección completa de IgM se captura y se inmoviliza en la fase sólida mediante una IgG anti-IgM específica).

La detección de señal en el inmunoensayo Elecsys® se basa en la electroquimioluminiscencia. Se inmovilizó el anticuerpo de captura de IgM conjugado con biotina sobre la superficie de perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina, mientras que el antígeno de señalización portaba un catión rutenio acomplejado como la fracción luminiscente. En presencia de anticuerpos IgM anti-p52/anti-pp150, se establecieron puentes entre el complejo cromogénico de rutenio y la fase sólida, emitiendo luz a 620 nm tras la excitación en un electrodo de platino. Los resultados de señal se proporcionan en unidades de luz arbitrarias. Para su utilización como antígenos Elecsys®, las proteínas de fusión p52/pp150 solubles a estudio se concentraron y se modificaron con grupos de rutenio activados con N-hidroxi-succinimida tal como describen Scholz *et al. supra*, 2005. La concentración de las variantes de fusión chaperones en las mediciones del inmunoensayo fueron de 20 a 100 ng/ml. Se utilizaron por lo menos cinco sueros negativos a modo de controles. Con el fin de minimizar los resultados falsos positivos, se añadieron módulos chaperones no marcados químicamente polimerizados a las muestras a modo de sustancia anti-interferencia.

2. Resultados

2.1 Rendimiento de expresión elevado

Skp, FkpA, SlyD y las variantes de fusión de los mismos se sobreexpresaron en abundancia en cepas *E. coli* BL21 (DE3). Debido a la elevada tasa de síntesis, las proteínas diana se acumularon parcialmente en forma de cuerpos de inclusión en el citosol de *E. coli*. El replegamiento acoplado a matriz resultó ser el método de elección para renaturalizar Skp, FkpA, SlyD y las variantes de fusión de las mismas a rendimientos muy elevados. Esencialmente, el protocolo de renaturalización siguió el método desarrollado para las proteínas de fusión SlyD (Scholz *et al., supra*, 2005; Scholz *et al., Biochemistry* 45:20-33, 2006). Tras el protocolo de purificación acoplada y replegamiento, pudieron obtenerse más de 20 mg de proteína diana a partir de 1 g de células de *E. coli* húmedas. A título de ejemplo, en la figura 1 se muestra la purificación de Skp-p52-X4 tal como se documenta mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 2: Ensayo de IgM contra CMV

Se desarrolló un ensayo para determinar los anticuerpos IgM dirigidos contra CMV. Este ensayo permite diferenciar

entre un estadio agudo/temprano de infección primaria y un estadio tardío de infección o una infección recurrente. El reactivo de detección comprende complejos, comprendiendo cada uno tres unidades de un polipéptido de fusión, comprendiendo cada uno el dominio de trimerización Skp y 4 epítopos de CMV (UL32 ó 150) marcados con (bipiridina)₃ de rutenio (BPRu). De esta manera, una molécula multimérica del reactivo de detección comprende 12 copias de epítipo. El ensayo se llevó a cabo en ausencia o en presencia de reactivos de eliminación de interferencias, es decir, con reactivo de eliminación de interferencias de IgG monomérica SlyD-X, en el que X es el epítipo UL32 ó 150, con reactivos de eliminación de interferencias de IgM dimérica o tetramérica (FkpA-X)₂ y (FkpA-X2)₂, en los que FkpA es un dominio de dimerización y X es el epítipo UL32 ó pp150, y con reactivos de eliminación de interferencias de IgM trimérica o hexamérica (Skp-X)₃ y (Skp-X2)₃, en los que Skp es un dominio de trimerización y X, el epítipo UL32 ó pp150.

1. Materiales y métodos

1.1 Componentes

Tampón B1

Variante 1:

tampón MES 50 mM, pH 6,5; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM, metilisotiazolona y oxipiriona al 0,1%; prolidocanol y albúmina de suero bovino al 0,2% (BSA) y 1 mg/l de Mab monoclonal humano-anti-IgM humana.

Variante 2:

Al igual que la variante 1 más 2 mg/l de SlyD-pp(UL32)x1 y 2 mg/ml de SlyD-pp(150)x1

Variante 3:

Al igual que la variante 1 más 2 mg/l de FkpA-pp(UL32)x1 y 2 mg/ml de FkpA-pp(150)x1

Variante 4:

Al igual que la variante 1 más 2 mg/l de Skp-pp(UL32)x1 y 2 mg/ml de Skp-pp(150)x1

Tampón B2

tampón MES 50 mM, pH 6,5; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; metilisotiazolona y oxipiriona al 0,1%; prolidocanol y albúmina de suero bovino al 0,2% (BSA).

Componentes inmunológicos en B2: antígenos de CMV rutenilados.

40 ng/ml de Skp-(pp150)x4-BPRu y 40 ng/ml de Skp-(UL32)x4-BPRu

2. Procedimiento de ensayo en el instrumento Elecsys 2010

10 µl de muestras de suero (1:20 con diluyente universal EleCsyst) + 75 µl de tampón B2. Tras un tiempo de incubación de 9 minutos, se añadieron 75 µl de tampón B2 y 40 µl de perlas recubiertas con estreptavidina. Tras 9 minutos, la mezcla se transportó a la celda de medición y se midió la señal de ECL.

3. Resultados

Se muestran los resultados del ensayo en las Tablas 1 y 2.

ES 2 368 624 T3

Tabla 1

Estado de la infección	Variante 1 sin inhibición	Variante 2 con inhibición de SlyD-X (monómero)		Variante 3 con inhibición de FkpA-X (dímero y trímero)		Variante 4 con inhibición de Skp-X (trímero y hexámero)		Ensayo de avidez RADIM
	pulsos	pulsos	% (respecto a Var. 1)	pulsos	% respecto a Var. 1	pulsos	% (respecto a Var. 1)	% de avidez
no infectado	724	759	104,8%	750	103,6%	757	104,6%	
no infectado	663	650	98,0%	663	100,0%	660	99,5%	
no infectado	607	604	99,5%	601	99,0%	617	101,6%	
no infectado	632	641	101,4%	629	99,5%	649	102,7%	
no infectado	795	804	101,1%	787	99,0%	777	97,7%	
agudo	4494	4401	97,9%	4365	97,1%	3653	81,3%	12%
agudo	6713	6439	95,9%	6165	91,8%	5482	81,7%	14%
agudo	12713	11905	93,6%	11438	90,0%	10081	79,3%	22%
agudo	25583	24779	96,9%	23140	90,5%	20089	78,5%	22%
agudo	101418	105922	104,4%	103361	101,9%	92796	91,5%	11%
agudo	10651	10442	98,0%	10060	94,5%	8480	79,6%	9%
agudo	16468	16148	98,1%	15054	91,4%	11905	72,3%	
agudo	104219	110150	105,7%	110754	106,3%	107816	103,5%	
agudo	219105	215878	98,5%	202350	92,4%	171314	78,2%	
Infección pasada	3610	3255	90,2%	1545	42,8%	1280	35,5%	87%
Infección pasada	10995	7779	70,8%	3717	33,8%	3183	28,9%	92%
reactivación	12388	10145	81,9%	4173	33,7%	2651	21,4%	
reactivación	6542	5579	85,3%	2493	38,1%	1791	27,4%	
reactivación	8649	8025	92,8%	3116	36,0%	1892	21,9%	
reactivación	9959	9548	95,9%	5761	57,8%	4976	50,0%	

Tabla 2

Estado de la infección	Variante 1 sin inhibición	Variante 2 con inhibición de SlyD-X (monómero)		Variante 3 con inhibición de FkpA-X (dímero y trímero)		Variante 4 con inhibición de Skp-X (trímero y hexámero)		Ensayo de avidez RADIM
	pulsos	pulsos	% (respecto a Var. 1)	pulsos	% (respecto a Var. 1)	pulsos	% (respecto a Var. 1)	% de avidez
No infectado	724	759	104,8%	750	103,6%	757	104,6%	
No infectado	663	650	98,0%	663	100,0%	660	99,5%	
No infectado	632	641	101,4%	629	99,5%	649	102,7%	
No infectado	795	804	101,1%	787	99,0%	777	97,7%	
agudo	18982	19145	100,9%	18905	99,6%	16878	88,9%	18%
agudo	31865	31861	100,0%	29462	92,5%	24688	77,5%	18%
agudo	32918	32801	99,6%	30490	92,6%	25012	76,0%	11%
agudo	41662	41577	99,8%	39666	95,2%	34284	82,3%	11%
agudo	25223	25171	99,8%	23405	92,8%	19732	78,2%	13%
agudo	52253	52175	99,9%	48414	92,7%	40789	78,1%	15%
agudo	20874	20687	99,1%	19276	92,3%	16271	77,9%	7%
agudo	16587	15791	95,2%	16218	97,8%	14982	90,3%	11%
agudo	47801	48075	100,6%	45351	94,9%	41383	86,6%	18%
Infección pasada	8432	8736	103,6%	4966	58,9%	2967	35,2%	83%
Infección pasada	14439	11351	78,6%	2508	17,4%	1910	13,2%	61%
Infección pasada	4693	3212	68,4%	976	20,8%	722	15,4%	93%
Infección pasada	4803	4468	93,0%	1710	35,6%	1112	23,2%	57%
Infección pasada	6058	5855	96,6%	3789	62,5%	2582	42,6%	71%
Infección pasada	28152	27962	99,3%	18064	64,2%	12521	44,5%	79%)

4. Análisis de los resultados

Se sometieron sueros de individuos no infectados, de pacientes que sufrían una infección aguda y de pacientes con una infección pasada a un ensayo inmunológico basado en formato μ -capture tal como se encuentra descrito. Se resumen los resultados en la Tabla 1. La primera columna (variante 1) ilustra las señales obtenidas en ausencia de ningún reactivo de eliminación de interferencias o módulo de inhibición. Los pulsos con los sueros humanos CMV-negativos eran de aproximadamente 700, y se observó una clara diferencia entre los sueros negativos y positivos. La segunda columna (variante 2) muestra las señales obtenidas en presencia del módulo de inhibición monomérico

SlyD-X. Tal como se pone de manifiesto en la intensidad de la señal residual (en %), el efecto de inhibición de SlyD-X era negligible tanto en sueros agudos como en sueros con infecciones pasadas. Lo anterior se encuentra en línea con lo esperado, debido a que SlyDX, en forma de monómero, no debería ser capaz de interactuar eficientemente con las moléculas polivalentes de IgM.

La tercera columna (variante 3) muestra las señales obtenidas en presencia del módulo de inhibición dimérico FkpA-X. La intensidad de la señal residual pone de manifiesto un efecto de inhibición negligible de FkpA-X en sueros agudos y un efecto de inhibición significativo de FkpA-X en sueros con infección pasada. Este resultado refleja la densidad más alta de epítomos (X) de FkpA-X con respecto a SlyD-X. Evidentemente, FkpA-X interactúa significativamente con las moléculas maduras de IgM de infecciones pasadas por CMV, pero interactúa bastante débilmente con moléculas de IgM temprana inmaduras de infecciones agudas por CMV.

En la penúltima columna (variante 4), se subrayan los efectos de inhibición del reactivo trimérico de eliminación de interferencias Skp-X. Se observa cierta inhibición de la señal en sueros agudos, pero una inhibición de la señal mucho más alta en los sueros con infección pasada. Lo anterior resulta indicativo de una interacción del módulo de inhibición Skp-X con moléculas de IgM tanto tempranas como tardías. Debido a que la interacción de Skp-X con moléculas de IgM tardías es mucho más fuerte en comparación con la interacción con moléculas de IgM tempranas, resulta posible una detección diferencial de los anticuerpos IgM tempranos indicativa de una infección aguda.

En resumen, SlyD-X, FkpA-X y Skp-X interactúan con moléculas de IgM dirigidas contra el epítipo X, inhibiendo de esta manera el ensayo μ -capture de señales, en el que se utiliza Skp-X4 como el antígeno de señalización. La eficiencia relativa de inhibición se incrementa en el orden SlyD-X<FkpA-X<Skp-X, correspondiente a la densidad efectiva de epítomos. La eficiencia de inhibición es elevada con moléculas de IgM madura (de infecciones pasadas), y es bastante baja con moléculas de IgM inmadura (de infecciones agudas).

Los resultados de los presentes inventores permiten discriminar claramente entre las infecciones tempranas y tardías, por ejemplo las infecciones víricas. Mediante la utilización de un reactivo de detección marcado con una densidad elevada de epítomos tales como un módulo de detección Skp-X4 (12 copias de epítipo) y módulos de inhibición no marcados con una densidad de epítomos más baja del tipo SlyD-X (1 copia de epítipo), FkpA-X (2 copias de epítipo) o Skp-X (3 copias de epítipo), puede llevarse a cabo una discriminación entre infecciones tempranas y tardías, lo que resulta clínicamente importante.

Hasta hoy, dicha discriminación no ha resultado posible entre diferentes fracciones de IgM pero se ha intentado mediante la realización de ensayos de avidez de IgG: en breve, se detecta IgG en ausencia y en presencia de concentraciones no desnaturizantes de un agente caótrópico tal como, por ejemplo, urea o cloruro de guanidinio. El caótro preferentemente reduce la unión de moléculas de IgG inmaduras ("tempranas"), pero sólo afecta ligeramente a las propiedades de unión de las moléculas maduras de alta afinidad ("tardías") de IgG. La proporción entre la altura de la señal en presencia y en ausencia de caótro rinde la fracción de moléculas de IgG de alta afinidad (resistentes a caótro). Un elevado porcentaje en un ensayo de avidez refleja una fracción predominante de moléculas de IgG de elevada afinidad, y un porcentaje bajo refleja una fracción predominante de moléculas de IgG de baja afinidad (tempranas). De esta manera, los porcentajes elevados en un ensayo de avidez son indicativos de una infección tardía, mientras que los porcentajes bajos son indicativos de una infección temprana.

La última columna en las Tablas 1 y 2 resume los resultados de los sueros de infecciones agudas y pasadas, que se sometieron a un ensayo comercial de avidez de IgG (RADIM). Resulta evidente que los sueros agudos muestran señales residuales bajas (<20%), mientras que los sueros de infecciones pasadas muestran señales residuales altas (>60%). Estos resultados concuerdan muy bien con el enfoque de inhibición de la invención. Lo anterior resulta notable debido a que el enfoque inventivo se centra en la detección diferencial de moléculas de IgM, mientras que los ensayos de avidez en general se centran en la detección diferencial de las moléculas de IgG. La información obtenida mediante los diferentes enfoques es complementaria: las inmunoglobulinas inmaduras (concomitantes con respuestas inmunológicas tempranas) conducen a una elevada inhibición en un ensayo de avidez de IgG (última columna), pero a una inhibición bastante baja en el ensayo de inhibición Skp-X de la invención (penúltima columna).

Las inmunoglobulinas maduras (concomitantes con infecciones pasadas o recurrentes) conducen a un grado bajo de inhibición en un ensayo de avidez de IgG (última columna), aunque a un grado de inhibición bastante elevado en el ensayo de inhibición Skp-X de la invención. Las inmunoglobulinas inmaduras (concomitantes con las infecciones agudas o tempranas) conducen a un grado elevado de inhibición en un ensayo de avidez de IgG, aunque a un grado bajo de inhibición en el ensayo de inhibición Skp-X según la invención. De esta manera, el enfoque inventivo a la detección diferencial de moléculas de IgM añade información valiosa al campo diagnóstico, en todos los casos en que resulte importante diferenciar entre estadios tempranos y posteriores de una infección y detectar estadios tempranos de una infección.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann - La Roche AG
	<120> Detección de infecciones primarias por patógenos
	<130> 39814P EP
	<140> EP07008124
	<141> 2007-04-20
10	<160> 9
	<170> PatentIn versión 3.3
	<210> 1
	<211> 165
15	<212> PRT
	<213> Artificial
	<220>
	<223> SlyD
20	<220>
	<221> MISC_FEATURE 15
	<222> (1)..(165)
	<223> SlyD (1-165)
25	<400> 1
	<210> 2
	<211> 245
30	<212> PRT
	<213> Artificial

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
1 5 10 15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
20 25 30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
35 40 45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
50 55 60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
65 70 75 80

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
85 90 95

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
100 105 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
115 120 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
130 135 140

Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
145 150 155 160

Asp His Asp His Asp
165

5 <220>
<223> FkpA

<220>
<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1) .. (245)
<223> FkpA (26-270)

<400> 2

15 <210> 3
<211> 141
<212> PRT
<213> Artificial

Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe
1 5 10 15

Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly
20 25 30

Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys
35 40 45

Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp
50 55 60

Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe
65 70 75 80

Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala
85 90 95

Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys
100 105 110

Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val
115 120 125

Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val
130 135 140

Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr
145 150 155 160

Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly
165 170 175

Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu
180 185 190

Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile
195 200 205

Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys
210 215 220

Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala
225 230 235 240

Asp Ser Ala Lys Lys
245

<220>

<223> Skp

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (141)

<223> Skp (21-161)

10 <400> 3

Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln Val
 1 5 10 15

Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Lys Gly
 20 25 30

Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys Met
 35 40 45

Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu Glu
 50 55 60

Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln Ala
 65 70 75 80

Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys Leu
 85 90 95

Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln Asp
 100 105 110

Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser Asp
 115 120 125

Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys
 130 135 140

<210> 4

<211> 230

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Skp-ppUL32-X1

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(230)

<223> Skp-ppUL32-X1 (ppUL32=pp150, 587-640)

25

<400> 4

<210> 5

<211> 400
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Skp-ppUL32-X4

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (400)
 <223> Skp-ppUL32-X4 (ppUL32=pp150, 587-640)

15 <400> 5

20 <210> 6
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Skp-pp150-X1

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(226)
 <223> Skp-pp150-X1 (pp150 999-1048)

 <400> 6

35 <210> 7
 <211> 386

40 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Skp-pp150-X4

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(386)
 <223> Skp-pp150-X4 (pp150 999-1048)

50 <400> 7
 <210> 8

55 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Skp-p52-X1

65 <220> <221> MISC_FEATURE 10
 <222> (1)..(216)
 <223> Skp-p52-X1 (p52 254-293)

<400> 8

<210> 9

<211> 345

5 <212> PRT

<213> Artificial

Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1 5 10 15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
20 25 30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
35 40 45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
50 55 60

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65 70 75 80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
85 90 95

Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
100 105 110

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
115 120 125

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

ES 2 368 624 T3

Gly Ser Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr
165 170 175

Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe
180 185 190

Ala Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr
195 200 205

Ala Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn Gly Gly Gly Leu Glu
210 215 220

His His His His His His
225 230

Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1 5 10 15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
20 25 30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
35 40 45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
50 55 60

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65 70 75 80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
85 90 95

Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
100 105 110

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
115 120 125

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr
 165 170 175
 Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe
 180 185 190
 Ala Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr
 195 200 205
 Ala Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn Gly Gly Gly Ala Gly
 210 215 220
 Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Ala Pro Pro Thr Phe Ala Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn
 245 250 255
 Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr Ala Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn
 260 265 270
 Pro Ala Asn Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro
 275 280 285
 Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr
 290 295 300
 Phe Ala Gly Thr Gln Thr Pro Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro
 305 310 315 320
 Thr Ala Pro Leu Pro Gly Asp Met Asn Pro Ala Asn Gly Gly Gly Ala
 325 330 335
 Gly Ala Gly Ala Ala Ile Leu Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr
 340 345 350
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe Ala Gly Thr Gln Thr Pro
 355 360 365
 Val Asn Gly Asn Ser Pro Trp Ala Pro Thr Ala Pro Leu Pro Gly Asp
 370 375 380
 Met Asn Pro Ala Asn Gly Gly Gly Leu Glu His His His His His His
 385 390 395 400

Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1 5 10 15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
20 25 30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
35 40 45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
50 55 60

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65 70 75 80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
85 90 95

Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
100 105 110

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
115 120 125

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Ser Gly Gly Gly Met Lys Thr Val Ala Phe Asp Leu Ser Ser Pro
165 170 175

Gln Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly Met Gly Gly
180 185 190

Ala Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu
195 200 205

Lys Ile Lys Asn Thr Glu Glu Gly Gly Gly Leu Glu His His His His
210 215 220

His His
225

ES 2 368 624 T3

Met	Ala	Asp	Lys	Ile	Ala	Ile	Val	Asn	Met	Gly	Ser	Leu	Phe	Gln	Gln	1	5	10	15
Val	Ala	Gln	Lys	Thr	Gly	Val	Ser	Asn	Thr	Leu	Glu	Asn	Glu	Phe	Arg	20	25	30	
Gly	Arg	Ala	Ser	Glu	Leu	Gln	Arg	Met	Glu	Thr	Asp	Leu	Gln	Ala	Lys	35	40	45	
Met	Lys	Lys	Leu	Gln	Ser	Met	Lys	Ala	Gly	Ser	Asp	Arg	Thr	Lys	Leu	50	55	60	
Glu	Lys	Asp	Val	Met	Ala	Gln	Arg	Gln	Thr	Phe	Ala	Gln	Lys	Ala	Gln	65	70	75	80
Ala	Phe	Glu	Gln	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Asn	Glu	Glu	Arg	Gly	Lys	85	90	95	
Leu	Val	Thr	Arg	Ile	Gln	Thr	Ala	Val	Lys	Ser	Val	Ala	Asn	Ser	Gln	100	105	110	
Asp	Ile	Asp	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Asn	Ala	Val	Ala	Tyr	Asn	Ser	Ser	115	120	125	
Asp	Val	Lys	Asp	Ile	Thr	Ala	Asp	Val	Leu	Lys	Gln	Val	Lys	Gly	Gly	130	135	140	

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Gly Gly Gly Met Lys Thr Val Ala Phe Asp Leu Ser Ser Pro
 165 170 175
 Gln Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly Met Gly Gly
 180 185 190
 Ala Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu
 195 200 205
 Lys Ile Lys Asn Thr Glu Glu Gly Gly Gly Met Lys Thr Val Ala Phe
 210 215 220
 Asp Leu Ser Ser Pro Gln Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser
 225 230 235 240
 Ala Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile
 245 250 255
 Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys Asn Thr Glu Glu Gly Gly Gly Met
 260 265 270
 Lys Thr Val Ala Phe Asp Leu Ser Ser Pro Gln Lys Ser Gly Thr Gly
 275 280 285
 Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr Pro Ser Asp
 290 295 300
 Ala Val Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys Asn Thr Glu
 305 310 315 320
 Glu Gly Gly Gly Met Lys Thr Val Ala Phe Asp Leu Ser Ser Pro Gln
 325 330 335
 Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly Met Gly Gly Ala
 340 345 350
 Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu Lys
 355 360 365
 Ile Lys Asn Thr Glu Glu Gly Gly Gly Leu Glu His His His His His
 370 375 380
 His His
 385

```

Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1          5          10          15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
          20          25          30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
          35          40          45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
50          55          60

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65          70          75          80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
          85          90          95

Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
          100          105          110

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
          115          120          125

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
130          135          140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145          150          155          160

Gly Ser Gly Gly Gly Val Ala Ser Arg Asn Gly Leu Phe Ala Val Glu
          165          170          175

Asn Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly Asp Pro Phe Asp Lys
          180          185          190

Asn Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195          200          205

Leu Glu His His His His His His
210          215

```

5 <220>
<223> Skp-p52-X4

<220>
<221> MISC_FEATURE <222> (1)..(345)

10 <223> Skp-p52-X4 (p52 254-293)

<400> 9

Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
 1 5 10 15
 Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
 20 25 30
 Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
 35 40 45
 Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
 50 55 60
 Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
 65 70 75 80
 Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
 85 90 95
 Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
 100 105 110
 Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
 115 120 125
 Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Gly Gly Gly Val Ala Ser Arg Asn Gly Leu Phe Ala Val Glu
 165 170 175
 Asn Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly Asp Pro Phe Asp Lys
 180 185 190

Asn	Tyr	Val	Gly	Asn	Ser	Gly	Lys	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	
		195					200						205				
Val	Ala	Ser	Arg	Asn	Gly	Leu	Phe	Ala	Val	Glu	Asn	Phe	Leu	Thr	Glu		
	210					215					220						
Glu	Pro	Phe	Gln	Arg	Gly	Asp	Pro	Phe	Asp	Lys	Asn	Tyr	Val	Gly	Asn		
225					230					235					240		
Ser	Gly	Lys	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Ser	Arg	Asn		
				245						250					255		
Gly	Leu	Phe	Ala	Val	Glu	Asn	Phe	Leu	Thr	Glu	Glu	Pro	Phe	Gln	Arg		
			260					265						270			
Gly	Asp	Pro	Phe	Asp	Lys	Asn	Tyr	Val	Gly	Asn	Ser	Gly	Lys	Ser	Arg		
		275					280						285				
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Ser	Arg	Asn	Gly	Leu	Phe	Ala	Val		
	290					295					300						
Glu	Asn	Phe	Leu	Thr	Glu	Glu	Pro	Phe	Gln	Arg	Gly	Asp	Pro	Phe	Asp		
305					310					315					320		
Lys	Asn	Tyr	Val	Gly	Asn	Ser	Gly	Lys	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly		
				325					330						335		
Gly	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His									
			340					345									

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de fusión que comprende:
 - (i) por lo menos un dominio de multimerización y
 - (ii) una pluralidad de copias de un segmento de epítopo procedente de un patógeno,
 en el caso de que el dominio de multimerización sea un chaperón procariótico o eucariótico seleccionado de entre el grupo que consiste de FkpA, Skp, SecB, Hsp25, MIP, GroEL, ClpB y ClpX.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende por lo menos 2 copias de dicho segmento epítopo.
3. Polipéptido según la reivindicación 1 ó 2, en el que la longitud de un segmento epítopo es de entre 5 y 120 aminoácidos.
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los segmentos epítopos se encuentran separados por secuencias espaciadoras.
5. Polipéptido según la reivindicación 4, en el que las secuencias espaciadoras presentan una longitud de entre 1 y 10 aminoácidos.
6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el segmento epítopo comprende un epítopo que resulta reconocido específicamente por anticuerpos presentes en una etapa temprana o aguda de una infección por dicho patógeno.
7. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el segmento epítopo comprende un epítopo que resulta reconocido específicamente por anticuerpos presentes en una etapa tardía de una infección por dicho patógeno o en una infección pasada.
8. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el segmento epítopo comprende un epítopo que resulta reconocido específicamente por anticuerpos presentes en una infección persistente o recurrente por dicho patógeno.
9. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho segmento epítopo procede de un patógeno vírico, bacteriano o protozoario.
10. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el organismo patógeno se selecciona de entre el grupo que consiste de:
 - (i) virus herpes tales como los virus humanos del Herpes simplex de tipos 1 y 2 (HHV1 y HHV2), el virus de la varicela zóster (HHV3), el virus de Epstein-Barr (HHV4/EBV) o el citomegalovirus humano (HHV5) y los virus humanos del herpes de tipos 6, 7 y 8,
 - (ii) el virus de la rubéola,
 - (iii) los virus de la hepatitis, tales como el virus de la hepatitis A (VAH), el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC),
 - (iv) paramixovirus tales como el virus del sarampión y el virus de la parotiditis,
 - (v) un organismo *Toxoplasma* y (vi) un organismo *Borrelia*.
11. Polipéptido según la reivindicación 10, en el que el patógeno se selecciona de entre los patógenos asociados a riesgos durante el embarazo.
12. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que porta por lo menos un grupo informador y/o de acoplamiento.
13. Polipéptido según la reivindicación 12, que porta un grupo biotina de acoplamiento.
14. Polipéptido según la reivindicación 12, que porta un grupo informador de electroquimioluminiscencia o un grupo informador hapteno.
15. Polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que se encuentra presente en forma de multímero.

16. Molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 5 17. Ácido nucleico según la reivindicación 16, en el que las partes del mismo codificantes de segmentos epítomos idénticos presentan una secuencia de nucleótidos diferente dentro del alcance de la degeneración del código genético.
- 10 18. Vector de expresión que comprende por lo menos un ácido nucleico según la reivindicación 16 ó 17 operativamente ligado a una secuencia de control de la expresión.
19. Célula huésped transfectada o transformada con una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 16 ó 17 ó un vector de expresión según la reivindicación 18.
- 15 20. Método para preparar un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende las etapas:
 - (i) proporcionar una célula huésped según la reivindicación 19,
 - 20 (ii) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones en las que se expresa el polipéptido de fusión, y
 - (iii) recuperar dicho polipéptido de fusión.
- 25 21. Método para preparar el polipéptido de fusión multimérico según la reivindicación 15, que comprende asociar una pluralidad de polipéptidos de fusión monoméricos bajo condiciones adecuadas para formar el multímero.
22. Utilización de un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 como reactivo de detección en un método para detectar un anticuerpo en una muestra.
- 30 23. Utilización según la reivindicación 22, en la que dicho anticuerpo es un anticuerpo IgM.
24. Utilización según la reivindicación 23 para la determinación diferencial de un anticuerpo IgM.
- 35 25. Utilización según la reivindicación 23 ó 24, en la que dicho anticuerpo es un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana o aguda de una infección.
26. Utilización de un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 como reactivo de eliminación de interferencias en un método para detectar un anticuerpo en una muestra.
- 40 27. Utilización según la reivindicación 26, en la que dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG.
28. Kit de reactivos de ensayo para detectar un anticuerpo en una muestra, que comprende por lo menos un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y componentes de ensayo adicionales.
- 45 29. Reactivo de ensayo según la reivindicación 28, en el que dicho polipéptido de fusión es un reactivo de detección.
30. Reactivo de ensayo según la reivindicación 28, en el que dicho polipéptido de fusión es un agente de eliminación de interferencias.
- 50 31. Método para detectar un anticuerpo dirigido contra un patógeno en una muestra, que comprende las etapas:
 - (i) incubar dicha muestra con un reactivo de ensayo que comprende por lo menos un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y componentes de ensayo adicionales, y
 - 55 (ii) determinar la presencia y/o concentración de dicho anticuerpo en dicha muestra mediante la evaluación de la reacción de los componentes de la muestra con el reactivo de ensayo.
- 60 32. Método según la reivindicación 31, en el que dicho reactivo de ensayo comprende un reactivo de detección y por lo menos un reactivo de eliminación de interferencias, y la etapa (ii) comprende determinar la reacción de componentes de la muestra deseados con el reactivo de detección, en el que los componentes de la muestra no deseados resultan capturados por el reactivo o reactivos de eliminación de interferencias.
- 65 33. Método según la reivindicación 31 ó 32, en el que dicho anticuerpo que debe detectarse es un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana o aguda de una infección primaria y el reactivo de ensayo comprende por lo menos un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que porta un grupo

informador y/o de acoplamiento.

34. Método según la reivindicación 33, en el que el reactivo de ensayo comprende además un reactivo de eliminación de interferencias para capturar anticuerpos IgG y/o un reactivo de eliminación de interferencias para capturar anticuerpos IgM presentes en una etapa tardía de una infección y/o en una infección recurrente.
35. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, en el que el reactivo de ensayo comprende un primer polipéptido de fusión que porta un grupo informador y un segundo polipéptido de fusión que porta un grupo de acoplamiento para la inmovilización en una fase sólida, y en el que el anticuerpo se determina mediante la formación de un complejo con el primer y segundo polipéptidos de fusión y detectando dicho complejo en dicha fase sólida.
36. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, en el que el reactivo de ensayo comprende un polipéptido de fusión que porta un grupo de acoplamiento para la inmovilización en una fase sólida y un receptor que reconoce el anticuerpo que debe determinarse que porta un grupo informador, y en el que el anticuerpo se determina mediante la formación de un complejo con el polipéptido de fusión y el receptor en dicha fase sólida.
37. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, en el que el reactivo de ensayo comprende un polipéptido de fusión que porta un grupo informador y un receptor que reconoce el anticuerpo que debe determinarse que porta un grupo de acoplamiento para la inmovilización en una fase sólida, y en el que el anticuerpo se determina mediante la formación de un complejo con el polipéptido de fusión y el receptor en dicha fase sólida.
38. Método para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM dirigido contra un patógeno en una muestra, en la que la muestra puede comprender un anticuerpo interferente seleccionado de entre un anticuerpo IgM interferente y/o un anticuerpo IgG interferente, comprendiendo las etapas:
 - (a) incubar dicha muestra con un reactivo de ensayo, que comprende:
 - (i) por lo menos un receptor R^1 que se une específicamente a anticuerpos IgM, en el que R^1 es un antígeno multimérico o un anticuerpo anti-IgM humana, y
 - (ii) por lo menos un receptor R^2 , que se une específicamente al anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente, en el que R^2 es un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y porta un grupo informador,
 - (b) permitiendo la formación de un complejo que comprende R^1 , dicho anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente y R^2 , portando dicho complejo un grupo informador, y
 - (c) determinar dicho grupo informador unido con R^2 a dicho anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente a modo de medida de dicho anticuerpo IgM en dicha muestra.
39. Método según la reivindicación 38, en el que el anticuerpo IgM que debe detectarse es un anticuerpo IgM presente en una etapa temprana o aguda de una infección, y en el que el anticuerpo IgM interferente es un anticuerpo IgM presente en una etapa tardía de una infección o en una infección pasada y/o un anticuerpo IgM presente en una infección persistente o recurrente.
40. Método según la reivindicación 39, en el que el receptor R^2 comprende por lo menos 6 copias de epítipo reconocidas por el anticuerpo IgM que debe detectarse.
41. Método según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 40, en el que el receptor R^1 porta un grupo de acoplamiento para la inmovilización en una fase sólida.
42. Reactivo de ensayo para detectar diferencialmente un anticuerpo IgM dirigido contra un patógeno en una muestra, en el que la muestra puede comprender un anticuerpo interferente seleccionado de entre un anticuerpo IgM interferente y/o un anticuerpo IgG interferente, comprendiendo:
 - (i) por lo menos un receptor R^1 que se une específicamente a anticuerpos IgM, en el que R^1 es un antígeno multimérico o un anticuerpo anti-IgM humana, y
 - (ii) por lo menos un receptor R^2 , que se une específicamente al anticuerpo IgM que debe detectarse diferencialmente, en el que R^2 es un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y porta un grupo informador.

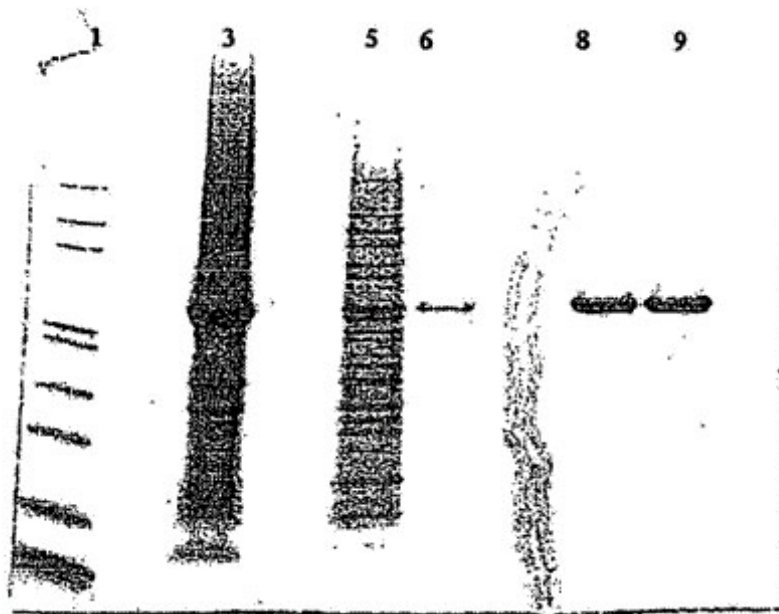


Figura 1

Figura 2A: SlyD (1-165)

```

1 MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLGHGGS LISGLETALE GHEVGDKFDV 60
61 AVGANDAYGQ YDENLVQVRP KDVFMGVDEL QVGMRFLET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD 120
121 GNMHLAQNL KFNVEVVAIR EATEEELANG HVHGAHDRHH DHDHD

```

Figura 2B: FkpA (26-270)

```

1 AEAAL PATAADSKAA FKNDQKSAY ALGASLGRYM 60
61 ENSLKEQEKI GIKLDKDLI AGVQDAFADK SKLSDQEIEQ TLQAFEARVK SSAQAKMEKD 120
121 AADNEAKGKE YREKFAKEKG VKTSSTGLVY QVVEAGKGEA PKDSDTVVVN YKGTLDIGKE 180
181 FDNSYTRGEP LSFRLDGVIP GWTEGLKNIK KGGKIKLVIP PELAYGKAGV PGIPPNSTLV 240
241 FDVELLDVCP APKADAKPEA DAKAADSARK

```

Figura 2C: Skp (21-161)

```

1 ADKIAIVNMG SLFQQVAQKT GVSNTLENEF KGRASELQRM 60
61 ETDLQAKMKK LQSMKAGSDR TKLEKDVMAQ RQTFAQKAQA FEQDRARRSN EERGKLVTRI 120
121 QTAVKSVANS QDIDLVDAN AVAYNSSDVK DITADVLKQV K

```

Figura 2D: Skp-ppUL32-X1 (ppUL32=pp150, 587-640)

```

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDLVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGGAG
AGAAILTPTPVNPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPL
PGDMNPANGGGGLEHHHHHH

```

Figura 2E: Skp-ppUL32-X4 (ppUL32=pp150, 587-640)

```

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDLVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGGAG
AGAAILTPTPVNPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPL
PGDMNPANGGGGAGAGAAILTPTPVNPSTAPAPAPTPTFAGTQT
PVNGNSPWAPTAPLPGDMNPANGGGGAGAGAAILTPTPVNPSTA
PAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPLPGDMNPANGGGGAG
GAAILTPTPVNPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPLP
GDMNPANGGGGLEHHHHHH

```

Figura 2F: Skp-pp150-X1 (pp150 999-1.048)

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDL VVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGMK
TVAFDLSSPQKSGTGPQPGSAGMGGAKTPSDAVQNILQKIEKI
KNTEEGGGLEHHHHH

Figura 2G: Skp-pp150-X4 (pp150 999-1.048)

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDL VVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGMK
TVAFDLSSPQKSGTGPQPGSAGMGGAKTPSDAVQNILQKIEKI
KNTEEGGGMKTVAFDLSSPQKSGTGPQPGSAGMGGAKTPSDA
VQNILQKIEKIKNTEEGGGMKTVAFDLSSPQKSGTGPQPGSAG
MGGAKTPSDAVQNILQKIEKIKNTEEGGGMKTVAFDLSSPQKS
GTGPQPGSAGMGGAKTPSDAVQNILQKIEKIKNTEEGGGLEHH
HHHH

Figura 2H: Skp-pp52-X1 (pp52 254-293)

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDL VVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGVA
SRNGLFAVENFLTEEPFQRGDPFDKNYVGNSGKSRGGGGGGLE
HHHHHH

Figura 2I: Skp-pp52-X4 (pp52 254-293)

MADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFRGRASELQRME
TDLQAKMKKLQSMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFE
QDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDL VVDANAVAY
NSSDVKDITADVLKQVKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGVA
SRNGLFAVENFLTEEPFQRGDPFDKNYVGNSGKSRGGGGGGV
ASRNGLFAVENFLTEEPFQRGDPFDKNYVGNSGKSRGGGGGG
VASRNGLFAVENFLTEEPFQRGDPFDKNYVGNSGKSRGGGGG
GVASRNGLFAVENFLTEEPFQRGDPFDKNYVGNSGKSRGGGG
GGLEHHHHHH