

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 354**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**C07K 16/12** (2006.01)

**C12N 15/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2009 E 09726757 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2261666**

54 Título: **Método para la detección de neumococos**

30 Prioridad:

**31.03.2008 JP 2008089619**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.01.2016**

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)  
2-9, Kanda-Tsukasamachi Chiyoda-ku  
Tokyo 101-8535, JP**

72 Inventor/es:

**AKAMATSU, SUGURU y  
SAIJO, YOKO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 556 354 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la detección de neumococos

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona con un método de ensayo inmunológico para detectar o cuantificar un antígeno neumocócico en una muestra derivada de un organismo vivo.

10 **Técnica anterior**

El neumococo (*Streptococcus pneumoniae*) es una de las bacterias patógenas más frecuentemente encontradas para la neumonía adquirida dentro de la comunidad y para las infecciones del tracto respiratorio inferior, que muestra una gran morbilidad y mortalidad a nivel mundial, incluyendo Japón. Dado que las infecciones causadas por el neumococo se producen con un gran índice de incidencia y tienden a hacerse severas, la selección de un fármaco antimicrobiano apropiado es clave para el tratamiento en su inicio. Según el principio del tratamiento de las infecciones, es también importante determinar la bacteria patógena en una fase lo más temprana posible, ya que se puede emplear un remedio apropiado en una fase precoz, lo que permite una mejora en el pronóstico, una reducción del coste médico y la prevención de la generación de bacterias resistentes. En tales circunstancias, existe una demanda en cuanto a un fármaco diagnóstico para detectar rápidamente un antígeno derivado de neumococo en una fase precoz de la infección.

Sorensen *et al.* han descrito la estructura del neumococo con detalle (Documento no de patente 1). La superficie más externa de la célula está formada por una cápsula y un antígeno de polisacárido, llamado polisacárido capsular, que está ligado a la cápsula. Hasta ahora, se conocen varias decenas o más de tipos séricos según varias estructuras de polisacáridos capsulares. Mientras tanto, el neumococo tiene una pared celular dentro de la cápsula y una membrana plasmática dentro de la pared celular. El polisacárido C (C-ps) está ligado a la pared celular, y el ácido teicoico o el ácido lipoteicoico, llamado "antígeno F", está ligado a la membrana plasmática. Se sabe que el C-ps es un antígeno común que se mantiene en todos los tipos de cápsula de las especies de neumococos, y se sabe que el resto de polisacárido del antígeno F tiene la misma secuencia de sacárido que la del C-ps.

Hasta ahora, se conocen métodos para detectar un antígeno neumocócico mediante el empleo de inmunoensayos. Como ejemplos de tales métodos, se incluyen un método de detección en el cual se detecta un antígeno C-ps en una muestra de esputo mediante ELISA empleando un anticuerpo anti-C-ps (Documentos no de patente 2, 3) y un método de detección en el cual se detecta un polisacárido capsular (antígeno) en una muestra de suero o una muestra de orina por inmunoelectroforesis (Documentos no de patente 4, 5).

Convencionalmente, se han utilizado kits de detección de neumococos basados en el método de aglutinación con látex, detectando estos kits un antígeno neumocócico en una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de suero o una muestra de orina. Se piensa que el principio de los kits se basa en la detección de un resto de polisacárido del polisacárido capsular o similar (Documentos no de patente 6, 7). Actualmente, sin embargo, substancialmente no se emplea ningún kit basado en el método de aglutinación con látex debido a que requieren una laboriosa operación y a su sensibilidad insatisfactoria.

Actualmente, se emplean medios de detección más simples. Uno de tales medios es un kit de detección rápida para un antígeno en la orina (Binax NOW (marca registrada), prueba de antígenos urinarios de *Streptococcus pneumoniae*, producto de Binax Inc.). En este kit, se detecta el C-ps presente en una muestra de orina por inmunocromatografía (Documento de patente 1). Este método es no invasivo, ya que se detecta un antígeno en una muestra de orina. El tiempo necesario para la detección es tan sólo de aproximadamente 15 minutos (Documento no de patente 8). Sin embargo, este método (detección de antígeno en orina) presenta un inconveniente, en el sentido de que se puede obtener un resultado falso positivo debido a la excreción continua de neumococos durante un largo período de tiempo tras finalizar la terapia relevante (Documento no de patente 9). Además, es difícil recoger orina de niños pequeños, y se puede obtener un resultado falso positivo por influencia de un neumococo indígena (Documento no de patente 10). Se piensa que el kit proporciona una sensibilidad ligeramente baja (Documento no de patente 11).

Un kit más recientemente desarrollado; es decir, un kit de detección de antígenos neumocócicos (Documento no de patente 12), detecta rápidamente un antígeno neumocócico (C-ps) en una muestra de esputo, un frotis de la cavidad nasal, un frotis de la epifaringe, una muestra de fluido del oído medio o un fluido otorreico, mediante inmunocromatografía empleando un anticuerpo policlonal anti-C-ps (conejo). En comparación con el kit de diagnóstico antes mencionado para un antígeno en orina, el kit recientemente desarrollado alcanza una gran sensibilidad y permite analizar una muestra clínica (v.g., frotis) sin tener que realizar previamente una operación de concentración. Además, se puede realizar la detección del antígeno en una muestra de fluido del oído medio, lo cual

era antes difícil. A diferencia de una muestra de orina, se puede obtener fácilmente una muestra de niños pequeños. Sin embargo, cuando se analizan mediante el kit ciertas muestras, tales como las derivadas del oído medio y de los senos paranasales, la sensibilidad resulta aún insatisfactoria. Por lo tanto, existe una demanda en cuanto a un método de detección de antígenos que alcance una mayor sensibilidad.

Como se ha descrito anteriormente, ya se han reportado kits de detección de antígenos neumocócicos que detectan antígenos capsulares o C-ps. De estos dos tipos de kits, los kits que detectan antígenos capsulares requieren disponer de diversos anticuerpos correspondientes a diversos antígenos capsulares y, por lo tanto, dichos kits no son de utilidad como una herramienta de ensayo simple. En cuanto al segundo tipo, es decir, los kits que detectan C-ps, se requiere un mayor aumento en la sensibilidad considerando los resultados de las pruebas de rendimiento de los kits existentes antes mencionados.

Por el contrario, el antígeno F no ha sido empleado en pruebas clínicas rutinarias. Aunque se han desvelado algunos métodos de detección inmunológicos en los que se emplea un anticuerpo antiantígeno F para detectar una bacteria que contiene un antígeno neumocócico (Documentos no de patente 13 a 15), en estos métodos se puede producir una reacción cruzada entre diferentes bacterias, y se puede obtener un resultado falso negativo que ocasione problemas en la precisión del ensayo.

Documentos de la técnica relacionada

Documento de patente 1: Patente Estadounidense N° 6.824.997.

Documento no de patente 1: Sorensen, Danish Medical Bulletin 42: 47-53 (1995).

Documento no de patente 2: Holmberg *et al.*, J. Clin. Microbiol. 22: 111-115 (1985).

Documento no de patente 3: Sjogren *et al.*, Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 6: 239-248 (1987).

Documento no de patente 4: Coonrod *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 81: 778-786 (1973).

Documento no de patente 5: Feigin *et al.*, The Journal of Pediatrics 89: 773-775 (1976).

Documento no de patente 6: Ajello *et al.*, J. Clin. Microbiol. 25: 1388-1391 (1987).

Documento no de patente 7: Ballard *et al.*, Pediatr. Infect. Dis. J. 6: 630-634 (1987).

Documento no de patente 8: Takao KOBAYASHI *et al.*, The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases, Vol. 76, No. 12: 995-1002 (2002).

Documento no de patente 9: Kazuhiro TATEDA, Modern Media, Vol. 51, No. 6: 129-132 (2005).

Documento no de patente 10: Akiyoshi NARIAI *et al.*, The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases, Vol. 78, No. 1: 18-21 (2004).

Documento no de patente 11: Tzeng *et al.*, J. Microbiol. Immunol. Infect. 39: 39-44 (2006).

Documento no de patente 12: Koji HIGASHIKAWA *et al.*, Journal of Clinical Pediatrics, 58(1): 139-143 (2005).

Documento no de patente 13: Kolberg *et al.*, Microbial Pathogenesis 22: 321-329 (1997).

Documento no de patente 14: Stuert *et al.*, J. Clin. Microbiol. 36: 2346-2348 (1998).

Documento no de patente 15: Mattie *et al.*, J. Antimicrob. Chemother. 56: 154-159 (2005).

**Divulgación de la invención** El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones es facilitada únicamente a modo de información.

#### Problemas que la invención ha de resolver

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método de detección inmunológico que puede detectar o cuantificar un antígeno neumocócico en una muestra derivada de un organismo vivo conveniente y rápidamente y con una gran sensibilidad. Es otro objeto de la invención proporcionar un anticuerpo para uso en el método.

#### Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han realizado amplios estudios sobre el método que puede detectar o cuantificar un antígeno neumocócico con mayor sensibilidad y han producido un anticuerpo que reconoce específicamente, entre los antígenos de polisacáridos neumocócicos, un antígeno F neumocócico, que no ha sido substancialmente utilizado para detectar un antígeno neumocócico. Como resultado, los inventores han visto que, mediante el método de ensayo inmunológico que emplea el anticuerpo producido, se puede estudiar rápidamente un antígeno neumocócico en una muestra derivada de un organismo vivo de un modo simple con mayor sensibilidad, en comparación con los métodos convencionales. La presente invención ha sido llevada a cabo en base a este descubrimiento.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno F neumocócico. La presente invención proporciona también un método para detectar o cuantificar un antígeno neumocócico, **caracterizado por que** el método detecta o cuantifica un antígeno F neumocócico en una muestra

derivada de un organismo vivo mediante un ensayo inmunológico empleando el anticuerpo. La presente invención proporciona también un kit para detectar un antígeno neumocócico, conteniendo el kit el anticuerpo.

### Efectos de la invención

La presente invención proporciona un nuevo anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno F neumocócico y un método para detectar o cuantificar un antígeno neumocócico rápidamente de un modo simple, **caracterizado por que** el método detecta o cuantifica un antígeno F neumocócico en una muestra derivada de un organismo vivo mediante un ensayo inmunológico empleando el anticuerpo. Según el método de la presente invención, se puede detectar o cuantificar un antígeno neumocócico con mayor sensibilidad en comparación con los métodos convencionales. Se pueden obtener así resultados de ensayo fiables, sin tener que realizar un procedimiento de concentración de la muestra, a partir de orina, esputo o frotis de la cavidad nasal o de la epifaringe, así como de muestras derivadas del oído medio o de los senos paranasales, necesiéndose detectar estas muestras con mayor sensibilidad en comparación con las sensibilidades convencionalmente obtenidas. Además, el método de la presente invención es clínicamente útil, ya que el método puede aumentar la precisión y reducir el tiempo necesario para identificar la bacteria causante de enfermedades tales como meningitis, otitis media y sepsis, causadas por neumococos.

### Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] Reactividad de antisueros diluidos 10.000 veces (Nº 1 a 11) derivados de cinco conejos con una placa inmovilizada con antígeno F (F-Ag) y con una placa inmovilizada con BSA (BSA).

[Fig. 2] Evaluación de los sistemas de ensayo ELISA. A: Sistema de ensayo ELISA en sándwich empleando un anticuerpo policlonal antiantígeno F. B: Sistema de ensayo ELISA en sándwich empleando un anticuerpo policlonal anti-C-ps. F-Ag: Muestra que contiene un antígeno F. C-ps: Muestra que contiene un antígeno C-ps.

[Fig. 3] Evaluación de la sensibilidad de los sistemas ELISA por ensayo de extractos de una cepa de neumococo cultivada (ATCC 49619). ELISA C-ps: Sistema ELISA en sándwich que emplea un anticuerpo policlonal anti-C-ps. ELISA F-Ag: Sistema ELISA en sándwich que emplea un anticuerpo policlonal antiantígeno F.

[Fig. 4] Evaluación de la especificidad de los anticuerpos de la presente invención. Especificidad de la reacción de los anticuerpos policlonales antiantígeno F derivados de los antisueros producidos en el Ejemplo 1 (Nº 1 a 11) y del anticuerpo antifosfolina conocido (HAS).

[Fig. 5] Evaluación de la especificidad del sistema ELISA empleando el anticuerpo de la presente invención. Reactividad con las bacterias enumeradas en la Tabla 1.

[Fig. 6] Ejemplos de la estructura de las tiras inmunocromatográficas. A: Tira antes de su uso, no se observa ninguna línea en la porción de nitrocelulosa. B: Tira después de su uso, se observa una línea si es negativo (superior) y se observan dos líneas si es positivo (inferior). C: estructura de la tira laminada. D: Estuche de plástico que contiene una tira.

[Fig. 7] Evaluación de la sensibilidad de la inmunocromatografía para la detección del antígeno F y modo de ensayo. A: Modo de ensayo de una solución de muestra. B: Inmunocromatografía de muestras purificadas de antígeno F con varias concentraciones. C: Inmunocromatografía de muestras de extractos de la cepa cultivada de neumococo (ATCC 49619) con varias concentraciones celulares.

### Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han concebido el uso del antígeno F, que no ha sido empleado en los kits convencionales de detección de antígenos neumocócicos, y han producido un anticuerpo antiantígeno F. Bastante sorprendentemente, el anticuerpo antiantígeno F así producido de la presente invención no exhibía substancialmente reactividad cruzada con *Haemophilus influenzae*, con el que mostraba reactividad un anticuerpo monoclonal antiantígeno F convencional (Fig. 4), y el sistema ELISA que utilizaba el anticuerpo no exhibía substancialmente reactividad cruzada con una variedad de bacterias, incluyendo *Haemophilus influenzae* (Fig. 5). Se ha reportado que el antígeno F y el C-ps tienen la misma estructura de polisacárido (véase, por ejemplo, Sorensen, Danish Medical Bulletin 42: 47-53 (1995)). Sin embargo, el anticuerpo antiantígeno F de la presente invención no exhibía substancialmente reactividad con C-ps (Fig. 2). Es decir, que el anticuerpo antiantígeno F de la presente invención es un nuevo anticuerpo que difiere por completo de los anticuerpos antiantígeno F o los anticuerpos anti-C-ps convencionales, que es altamente específico para el antígeno F y que reconoce un resto de polisacárido. Cuando se midió la sensibilidad de un sistema de ensayo para un antígeno neumocócico empleando el anticuerpo antiantígeno F de la presente invención, se observó una sensibilidad notablemente alta con respecto a la misma muestra en comparación con un sistema de ensayo que empleara un anticuerpo para C-ps (Fig. 3).

Como se describe aquí a continuación, el anticuerpo antiantígeno F de la presente invención puede ser producido mediante el método descrito en los Ejemplos de referencia. Concretamente, se prepara un antígeno F por un método conocido (véase, por ejemplo, Poxton *et al.*, Biochem. J. 175: 1033-1042 (1978)). Se puede emplear tal cual el antígeno F así preparado como inmunógeno. Preferiblemente, se copula el antígeno F preparado con una proteína

de soporte (v.g., el método de la maleimida o el método del disulfuro de piridilo), y se usa el antígeno F copulado como inmunógeno. Utilizando el inmunógeno producido, se puede producir un anticuerpo antiantígeno F correspondiente por un método conocido. Utilizando el antígeno copulado como inmunógeno, se puede producir un anticuerpo antiantígeno F que no tiene reactividad cruzada con *Haemophilus influenzae* y que tiene una gran especificidad hacia los neumococos.

No se impone ninguna limitación en particular sobre la proteína de soporte para uso en la reacción de copulación, siempre que la proteína sea de uso general en la técnica. Como ejemplos de la proteína, se incluyen BSA (seroalbúmina bovina), KLH (hemocianina de lapa), OVA (ovoalbúmina) y un extracto de *Ascaris* (extracto bruto). No se impone ninguna limitación en particular sobre el agente entrecruzante para uso en la copulación de la proteína de soporte y el antígeno F, siempre que el agente entrecruzante sea de uso general en la copulación de proteínas o péptidos. Se prefiere un reactivo de reacción divalente hetero que entrecruce un grupo SH y un grupo amino. Como ejemplos específicos, se incluyen m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), N-(4-maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBS), N-(6-maleimidocaproiloxi)succinimida (EMCS), N-(8-maleimidocapriloxi)succinimida (HMCS), N-(11-maleimidoundecanoiloxi)succinimida (KMUS), N-((4-(2-maleimidoetoxi)succinil)oxi)succinimida (MESS), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBS), N-(4-maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida (sulfo-GMBS), N-(6-maleimidocaproiloxi)sulfosuccinimida (sulfo-EMCS), N-(8-maleimidocapriloxi)sulfosuccinimida (sulfo-HMCS), N-(11-maleimidoundecanoiloxi)sulfosuccinimida (sulfo-KMUS) y sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC).

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, siempre que el anticuerpo responda a un antígeno F neumocócico, y además incluye un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos substancialmente idéntica al anticuerpo anterior. El anticuerpo de la presente invención también incluye el correspondiente anticuerpo de la molécula entera, un anticuerpo recombinante del mismo, un fragmento o producto modificado del mismo y un anticuerpo bivalente o monovalente correspondiente.

Se puede producir el anticuerpo monoclonal inmunizando a un ratón o una rata inyectándole subcutánea, intraperitoneal o intramuscularmente el inmunógeno antes mencionado o el inmunógeno y un adyuvante adicional (v.g., adyuvante de Freund), produciendo un hibridoma de inmunocitos del animal inmunizado y células de mieloma y seleccionando un hibridoma que produce un anticuerpo específico de interés entre los hibridomas producidos. Se lleva a cabo la inmunización una o varias veces en semanas alternas utilizando un antígeno en una cantidad de, por ejemplo, 0,1 a 100 µg/organismo o en una cantidad absoluta de 0,1 a 100 µg/organismo reducida a la proteína de soporte usada en la copulación, preferiblemente de 1 a 10 µg/organismo.

Se puede producir el anticuerpo policlonal por inmunización de un conejo o una cabra mediante inyección subcutánea del inmunógeno antes mencionado y un adyuvante adicional (v.g., adyuvante de Freund). Se lleva a cabo la inmunización una o varias veces en semanas alternas utilizando un antígeno en una cantidad de, por ejemplo, 10 a 500 µg/organismo o en una cantidad absoluta de 0,1 a 1.000 µg/organismo reducida a la proteína de soporte usada en la copulación, preferiblemente de 10 a 500 µg/organismo. Se toma una muestra de sangre del animal así inmunizado y se recoge una fracción de IgG por un método conocido, tal como purificación de afinidad (utilizando Proteína A o similares) o resina de intercambio iónico. Si es necesario, se puede realizar en combinación un procedimiento de purificación adicional (v.g., purificación mediante filtración por gel).

Se desvela que el término "un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos substancialmente idéntica" se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos equivalente a la del anticuerpo original, excepto por el hecho de que se han eliminado, substituido, insertado o añadido de uno a varios (v.g., de 1 a 30, preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10, incluso más preferiblemente de 1 a 5) residuos de aminoácidos, y que responde a un antígeno F. Las técnicas para eliminar, substituir, insertar o añadir de uno a varios residuos de aminoácidos en una secuencia específica de aminoácidos son conocidas en este campo. Por ejemplo, se pueden emplear una variedad de métodos, tales como la mutagénesis específica de sitio.

También se desvela que, siempre que se asegure una respuesta a un antígeno F neumocócico, "el anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos substancialmente idéntica" también incluye un anticuerpo que tiene una identidad de secuencia del 80% o más, preferiblemente del 85% o más, más preferiblemente del 90% o más, incluso más preferiblemente del 95% o más, con respecto a la del anticuerpo original. Se determina la identidad entre secuencias de aminoácidos mediante, por ejemplo, el método de Lipman-Pearson (Science, 227, 1435 (1985)). Específicamente, se calcula la homología mediante análisis usando un programa de análisis de homología (búsqueda de homología) de un software de procesamiento de información genética Genetyx-Win (Ver. 5.1.1) (Software Development Co., Ltd.), estableciendo ktup (tamaño de la unidad para hacer la comparación) en 2.

Como ejemplos del fragmento de anticuerpo, se incluyen Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fab/c y Fv de cadena sencilla (scFv). Estos fragmentos de anticuerpo pueden ser producidos tratando el correspondiente anticuerpo con una enzima (v.g.,

papaína o pepsina) o produciendo un gen codificante de dicho fragmento y expresando el gen en cualquier célula huésped (véanse, por ejemplo, Co, M. S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Plueckthun, A. & Skerra, A., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669; o Bird, R. E. *et al.*, TIBTECH (1991) 9, 132-137).

Se puede producir el fragmento scFv por unión de la región V de la cadena H de un anticuerpo a la región V de su cadena L. En scFv, la región V de la cadena H y la región V de la cadena L se unen preferiblemente por medio de un conector, preferiblemente un conector peptídico (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883). En un método alternativo, se produce un gen codificante de dicho péptido conector y se expresa el gen en cualquier célula huésped. Se puede producir el producto modificado del anticuerpo por modificación química del anticuerpo. Se puede producir el anticuerpo recombinante expresando cualquier gen de anticuerpo mutado en células huésped. Los métodos para producir anticuerpos recombinantes y productos modificados de anticuerpos son conocidos en la técnica.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar o cuantificar un antígeno neumocócico, **caracterizado por que** el método consiste en detectar o cuantificar un antígeno F neumocócico en una muestra derivada de un organismo vivo mediante un ensayo inmunológico empleando el anticuerpo antiantígeno F de la presente invención. Dado que el método de detección según la presente invención permite la detección rápida, simple y altamente sensible de un antígeno neumocócico, se puede realizar un diagnóstico rápido y correcto. Gracias al empleo del método de cuantificación según la presente invención, se pueden determinar el efecto y otras propiedades del fármaco con respecto a una enfermedad causada por neumococos de una forma rápida, conveniente y altamente sensible. Así, estos métodos contribuyen a la selección en fase temprana de un método terapéutico apropiado.

No se impone ninguna limitación particular sobre la muestra derivada de un organismo vivo, y como ejemplos se incluyen muestras derivadas de organismos vivos tales como tejidos, órganos y fluidos corporales (*v.g.*, esputo, frotis de la cavidad nasal o de la epifaringe, fluido del oído medio, fluido otorreico, fluido de los senos paranasales, líquido cefalorraquídeo, orina, sangre y linfa), y muestras derivadas de productos cultivados de los mismos. La muestra deriva preferiblemente de esputo, frotis de la cavidad nasal o de la epifaringe, fluido del oído medio, fluido otorreico, fluido de los senos paranasales, líquido cefalorraquídeo, orina, sangre o linfa. Si es necesario, se somete la muestra a un tratamiento preliminar rutinario, tal como un tratamiento con un surfactante, un ácido o un álcali, y extracción, concentración, dilución, etc. con calor o por otros medios.

El método de la presente invención proporciona una mayor sensibilidad en comparación con los métodos de ensayo convencionales. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, se estudian muestras que no pueden ser analizadas con una sensibilidad satisfactoria mediante los métodos de ensayo convencionales, *v.g.*, fluido del oído medio, fluido otorreico, fluido de los senos paranasales, líquido cefalorraquídeo y muestras derivadas de sangre. Por ejemplo, como el neumococo es una bacteria causal para la meningitis, la otitis media, la sepsis, etc., se puede identificar la bacteria causal para estas enfermedades con una mayor sensibilidad estudiando el fluido del oído medio, el fluido otorreico, el fluido de los senos paranasales, el líquido cefalorraquídeo o una muestra derivada de sangre mediante el método de la presente invención.

En el método de la presente invención, se puede emplear cualquier método de inmunoensayo conocido en la técnica como método de ensayo inmunológico. Como ejemplos de tales métodos, se incluyen el radioinmunoensayo (RIA), el enzimoimmunoensayo (EIA), tal como el ELISA, el método de aglutinación con látex (LTIA) y la inmunocromatografía. Desde el punto de vista de la sensibilidad en la detección, se emplea preferiblemente el ensayo en sándwich. Desde el punto de vista de la realización de un análisis simple y rápido, se prefiere la inmunocromatografía. Cuando se emplea la inmunocromatografía, se puede completar el diagnóstico de un paciente al lado de la cama o de un paciente ambulatorio en un corto período de tiempo.

En el ensayo inmunológico antes mencionado, se puede usar cualquier sustancia de marcaje empleada en la técnica. Como ejemplos de dichas sustancias de marcaje, se incluyen enzimas, tales como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina y la  $\beta$ -galactosidasa; radioisótopos (RI), tales como  $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$  y  $^3\text{H}$ ; sustancias fluorescentes, tales como FITC y tiocianato de tetrametilrodamina; sustancias luminiscentes, tales como sustancias quimioluminiscentes; y sustancias visualizadoras, tales como oro coloidal y látex coloreado. De manera alternativa, también se puede emplear un sistema de sensibilización que utiliza avidina marcada con una de las sustancias de marcaje antes mencionadas tras un marcaje primario con biotina, o un método de detección que utiliza una sustancia que tiene afinidad por una sustancia de bajo peso molecular, tal como digoxigenina, y que está marcada con una de las sustancias de marcaje antes mencionadas (*v.g.*, anticuerpo) tras un marcaje primario con la sustancia de bajo peso molecular.

La presente invención también proporciona un kit para detectar un antígeno neumocócico, donde el kit emplea el

método de detección o cuantificación de la presente invención. El kit de la presente invención contiene un anticuerpo según la invención que reconoce específicamente un antígeno F neumocócico. El kit de la presente invención puede también contener otros reactivos y materiales para uso en inmunoensayo. Por ejemplo, el kit de la presente invención, que contiene el anticuerpo de la presente invención, puede además contener una fase sólida para uso en inmunocromatografía, ELISA o el método de aglutinación con látex (v.g., tira, placa y perlas), y un reactivo, tal como una sustancia de marcaje.

### Ejemplos

La presente invención será descrita a continuación con detalle por medio de ejemplos, que no se ha de considerar que limitan la invención a los mismos.

#### Ejemplo de referencia 1: Preparación de inmunógeno para producir anticuerpo antiantígeno F

1) Preparación de antígeno F

Se preparó un antígeno F según un método de Poxton *et al.* (Biochem. J. 175: 1033-1042 (1978)). En primer lugar, se cultivó neumococo usando medio de agar sangre de oveja o caldo de infusión de cerebro y corazón, y se recuperaron las pellas de neumococo por raspado o centrifugación. Se suspendieron las pellas así recuperadas en agua purificada en una cantidad apropiada y se rompieron por ultrasonidos. Se calentó este producto y se centrifugó después, para recuperar así pellas. Se repitió el procedimiento de suspensión de las pellas en agua purificada, ultrasonificación y centrifugación varias veces, para eliminar así suficientemente los componentes hidrosolubles. Se añadieron las pellas insolubles en agua así obtenidas a SDS hervido para ajustar la concentración final al 2,5% de SDS, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante varias horas. Se repitió el procedimiento de centrifugación y lavado con agua varias veces, para recuperar así un componente insoluble. Se disolvió el componente insoluble en TCA a una concentración final del 10% (solución de TCA) y se agitó la solución enfriando durante varias horas o más. Tras centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se eliminó el TCA usando éter dietílico o similar. Se dializó el producto frente a agua purificada. Se liofilizó la solución así obtenida, para obtener de este modo un polvo blanco, que se pensaba era una mezcla de un antígeno F y ácido nucleico. Sin embargo, como el ácido nucleico no tiene inmunogenicidad, se empleó el polvo obtenido como antígeno para producir un anticuerpo antiantígeno F (antígeno F) en la etapa siguiente.

2) Evaluación de la pureza del antígeno F

Se pesó el polvo blanco (1 mg) y se disolvió en agua ultrapura (1 ml), y se comprobó la copresencia de proteína en la solución por medio de un kit de ensayo de proteínas comercial (método del ácido bicinónico: kit de medición de BCA, producto de Pierce). La concentración de la proteína era inferior a 31,25 µg/ml, que era el nivel mínimo de detección del kit de medición de BCA, lo que indica que la cantidad de proteína copresente en la solución era extremadamente pequeña.

3) Preparación del inmunógeno

Haciendo referencia al informe de Szu *et al.* (Infection and Immunity 54: 448-455 (1986)), se copuló el antígeno F antes obtenido con una proteína de soporte (KLH: hemocianina de *Limulus polyphemus*) o un extracto de *Ascaris* comercial (producido por LSL, distribuido por Cosmo Bio). Se emplearon el antígeno copulado a la proteína de soporte y el antígeno no copulado (antígeno F) como inmunógeno cada uno de ellos. Es decir, se realizó el siguiente procedimiento.

1: Se trató la proteína de soporte suspendida en tampón fosfato con un agente reductor de grupos SH (v.g., ditiotreitól o 2-mercaptoetanol). Después del tratamiento, se substituyó la mezcla por tampón fosfato mediante una técnica tal como filtración por gel o diálisis.

2: Paralelamente a la operación anterior, se disolvió una cantidad apropiada de antígeno F en tampón fosfato. Se añadió entonces un reactivo de reacción divalente (sulfo-SMCC o sulfo-KMUS) que entrecruza el SH libre y un grupo amino a la solución, en una cantidad de 0,1 a 2 mg (preferiblemente de 0,2 a 1 mg) con respecto al antígeno F (1 mg).

3: Se dejó que la mezcla reaccionara a temperatura ambiente y se retiró el exceso de cantidad del reactivo de reacción divalente mediante una técnica tal como diálisis o filtración por gel.

4: Se añadió el antígeno F tratado con el reactivo de reacción divalente en la operación 2 en una cantidad de 0,1 a 10 mg (preferiblemente de 0,5 a 5 mg) a la proteína de soporte reducida con SH (1 mg) obtenida mediante la operación 1.

5: Se llevó a cabo la reacción enfriando durante un período de tiempo suficiente y se dializó de nuevo la mezcla de reacción. Se empleó la solución así recuperada como inmunógeno para producir un anticuerpo para el antígeno F.

**Ejemplo 1: Producción de anticuerpo antiantígeno F**

## 1) Producción de anticuerpo policlonal antiantígeno F

5 Se inmunizó a conejos ( $n = 11$ ) con el inmunógeno producido en el Ejemplo de referencia 1 por inyección subcutánea con un adyuvante (v.g., adyuvante de Freund). La cantidad de inmunización era de 10 a 500  $\mu\text{g}/\text{organismo}$  en el caso del uso únicamente del antígeno F y de 0,1 a 1.000  $\mu\text{g}/\text{organismo}$ , preferiblemente de 10 a 500  $\mu\text{g}/\text{organismo}$  (cantidad absoluta de proteína de soporte) en el caso del antígeno copulado con proteína de soporte. Se realizó la inmunización una o varias veces en semanas alternas. Se tomaron muestras del antisuero

10 parcialmente y se comprobó su reactividad con el antígeno usado en la inmunización. Se recogió entonces un gran volumen o la totalidad del volumen de sangre. En el caso de la recogida de un gran volumen de sangre, se llevó a cabo la recogida varias veces mientras se continuaba con la inmunización, sin imponer una carga a cada animal. Se centrifugó la sangre entera así recogida y se congeló y almacenó la fracción de suero para que sirviera como antisuero. Se descongeló una cantidad apropiada del antisuero y se purificó por afinidad usando Proteína A o similar, por medio de resina de intercambio iónico, etc., para obtener así una fracción de IgG. Según las

15 necesidades, se realizó una purificación mediante filtración por gel en combinación.

## 2) Producción de anticuerpo monoclonal antiantígeno F

20 Se inmunizó a ratones o ratas con el inmunógeno producido en el Ejemplo de referencia 1 inyectándoles subcutánea, intraperitoneal o intramuscularmente el inmunógeno o el inmunógeno y un adyuvante adicional (v.g., adyuvante de Freund). La cantidad de inmunización era de 0,1 a 100  $\mu\text{g}/\text{organismo}$  en el caso de la utilización únicamente de antígeno F y de 0,1 a 100  $\mu\text{g}/\text{organismo}$ , preferiblemente de 1 a 10  $\mu\text{g}/\text{organismo}$  (cantidad absoluta de proteína de soporte) en el caso del antígeno copulado a la proteína de soporte. Se llevó a cabo la inmunización

25 una o varias veces en semanas alternas. Se tomaron muestras del antisuero parcialmente y se comprobó su reactividad con el antígeno usado en la inmunización. Se extrajeron el bazo, el timo y los ganglios linfáticos de cada animal y se recuperaron los inmunocitos de los mismos. Se fusionaron los inmunocitos con células de mieloma murinas (v.g., P3U1) por un método conocido, tal como el método del polietilenglicol, para producir así hibridomas. Entre los hibridomas así producidos, se seleccionó por dilución limitante un hibridoma que reaccionaba con el

30 antígeno de interés. Se purificó un anticuerpo monoclonal a partir del líquido ascítico y del sobrenadante de cultivo del hibridoma así seleccionado mediante purificación por afinidad usando Proteína A o similares, por medio de una resina de intercambio iónico, etc. Según las necesidades, se realizó una purificación mediante filtración por gel en combinación.

35 **Ejemplo 2: Título de anticuerpos antiantígeno F**

Se diluyeron apropiadamente los antisueros, producidos a partir de 11 conejos en el Ejemplo 1 (es decir, N° 1 a N° 5: cinco conejos inmunizados con un antígeno producido con KLH como proteína de soporte entrecruzada con sulfo-SMCC; N° 6 a N° 9: cuatro conejos inmunizados con un antígeno producido a partir de un extracto de *Ascaris* como

40 proteína de soporte entrecruzada con sulfo-KMUS; y N° 10 y 11: dos conejos inmunizados sólo con antígeno F), (N° 1 a 5:  $\times 50.000$ , N° 6 a 9:  $\times 50.000$  y N° 10 y 11:  $\times 1.000$ ). Se evaluó el título de cada antisuero por reacción del antisuero con una placa con antígeno F inmovilizado. La Fig. 1 muestra los resultados. Como se ve claramente por la Fig. 1, todos los antisueros obtenidos de los 11 conejos resultaron tener una fuerte reacción con la placa que tenía antígeno F inmovilizado. También se vio que estos antisueros no reaccionaban con una placa que tenía

45 seroalbúmina bovina (BSA) inmovilizada y que servía como control. Por lo tanto, se vio que todos los sueros producidos mediante el método antes mencionado exhibían una intensa capacidad de respuesta antiantígeno F.

**Ejemplo 3: Reactividad antigénica en un ELISA en sándwich empleando anticuerpos antiantígeno F**

50 Se obtuvieron fracciones de IgG de los antisueros N° 1 y 5 entre los antisueros del Ejemplo 1 mediante purificación con Proteína A y purificación por filtración por gel. Usando estos anticuerpos policlonales, se establecieron sistemas de ensayo ELISA en sándwich y se evaluó su rendimiento. En otras palabras, se añadió cada una de las muestras que contenían el antígeno F o el C-ps (de 0,041 a 10 ng/ml) a una placa inmovilizada sobre la que se había fijado un anticuerpo purificado derivado del suero N° 5, para que el antígeno reaccionara así con el anticuerpo. En el sistema

55 de ensayo que emplea el anticuerpo antiantígeno F, se lavó la placa y se le añadió un anticuerpo purificado marcado con biotina derivado del suero N° 1, para que la muestra reaccionara así con la placa. Se lavó la placa de nuevo y se añadió a la placa estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP), para que la estreptavidina reaccionara así con la biotina. A continuación, se midió el desarrollo de color de la HRP por medio de un medidor de absorbancia. De un modo similar, se produjo un sistema de ensayo ELISA en sándwich que empleaba un anticuerpo

60 policlonal anti-C-ps mediante el uso de C-ps comercial, y se midió el desarrollo de color de la HRP.

En base a los datos de absorbancia obtenidos, se compararon los dos sistemas de ensayo entre sí. Hasta ahora, se ha reportado que el antígeno F y el C-ps tienen la misma estructura de polisacárido (Sorensen, Danish Medical

Bulletin 42: 47-53 (1995)). Por lo tanto, se pensó que ambos sistemas de ensayo daban una reacción cruzada con el C-ps y el antígeno F. Sin embargo, como se muestra en la Fig. 2, el sistema de ensayo ELISA en sándwich que emplea el anticuerpo policlonal antiantígeno F de la presente invención detectaba el antígeno F, pero no detectaba el C-ps (Fig. 2A). De forma similar, el sistema de ensayo ELISA en sándwich que emplea el C-ps detectaba el C-ps, pero no detectaba el antígeno F (Fig. 2B).

Por lo tanto, se vio que el anticuerpo antiantígeno F de la presente invención reconocía específicamente sólo el antígeno F. El anticuerpo antiantígeno F de la presente invención no tenía reacción cruzada con C-ps (Fig. 2), lo que indica que el anticuerpo es completamente nuevo y difiere de los anticuerpos anti-C-ps convencionalmente empleados.

#### **Ejemplo 4: Reactividad bacteriana en un ELISA en sándwich empleando anticuerpos antiantígeno F**

Se investigó la reactividad de los dos sistemas de ensayo ELISA en sándwich producidos en el Ejemplo 3 con un extracto de células de neumococos. El extracto celular era una solución producida rompiendo neumococos (ATCC 49619) obtenidos por cultivo por medio de un surfactante, ultrasonificación u otros medios. Como se muestra en la Fig. 3, el sistema de ensayo que emplea el anticuerpo antiantígeno F de la presente invención era capaz de detectar un antígeno neumocócico en el extracto de células de neumococos con una sensibilidad 100 veces mayor que la obtenida mediante el sistema de ensayo que emplea el anticuerpo anti-C-ps. Por consiguiente, se vio que el sistema ELISA que emplea el anticuerpo antiantígeno F de la presente invención detectaba neumococos en una muestra derivada de un organismo vivo con una sensibilidad notablemente elevada, en comparación con un sistema de ensayo para C-ps convencionalmente empleado. Notablemente, como se muestra en la Fig. 2, cuando se estudió el antígeno purificado, la sensibilidad era prácticamente la misma (aproximadamente 0,1 ng/ml) en ambos sistemas de ensayo. Por lo tanto, se sugirió que la diferencia en la sensibilidad observada al estudiar muestras derivadas de organismos vivos era concebiblemente atribuible a la diferencia en la cantidad de expresión entre los antígenos de los neumococos.

#### **Ejemplo 5: Reactividad cruzada de un sistema ELISA en sándwich que emplea anticuerpos antiantígeno F con otras especies bacterianas**

Los anticuerpos antiantígeno F y los sistemas de detección de antígeno F conocidos (Kolberg *et al.*, Microbial Pathogenesis 22: 321-329 (1997), o Stuert *et al.*, J. Clin. Microbiol. 36: 2346-2348 (1998)) emplean un resto de fosforilcolina como epítipo. Por lo tanto, se sugiere que estos anticuerpos y sistemas de detección tienen de manera poco ventajosa una fuerte reactividad cruzada con C-ps, *Haemophilus influenzae*, etc. distintos del antígeno F.

Por lo tanto, se investigaron los sistemas de ensayo ELISA en sándwich que emplean cada uno de los anticuerpos policlonales antiantígeno F de la presente invención derivados de los antisueros (Nº 1 a 11) producidos en el Ejemplo 1 en términos de reactividad cruzada entre bacterias. Como comparación, se realizó un experimento similar utilizando un anticuerpo monoclonal murino HAS que emplea un resto de fosforilcolina como epítipo (Statens Serum Institut, Denmark, Reference: Infection and Immunity 1984; 43: 876-878, Microbial Pathogenesis 1993; 14: 299-305).

##### **1) Reactividad cruzada entre neumococos y *Haemophilus influenzae***

Se rompieron las células cultivadas de los neumococos (ATCC 49619) y las de *Haemophilus influenzae* (Tipo B, ATCC 31441) por ultrasonificación. Se sometió cada extracto bacteriano a un ensayo de proteínas por medio de un kit de ensayo de proteínas comercial (método del ácido bicinonónico: kit de ensayo BCA, Pierce). Se diluyó el extracto de cada bacteria con D-PBS a una concentración de 1,0 µg/ml y se inmovilizó la solución durante la noche en una placa de ELISA. Se bloqueó la placa mediante una técnica convencional y se hizo que cada uno de los antisueros apropiadamente diluidos producidos en el Ejemplo 1 (Nº 1 a 5: ×50.000, Nº 6 a 9: ×50.000 y Nº 10 y 11: ×1.000) o un líquido diluido del anticuerpo HAS antes mencionado (x125) reaccionara con la placa. A continuación, se reveló el color de cada placa con un anticuerpo IgG anticonejo marcado con HRP o un anticuerpo IgM antirrátón marcado con HRP, y se midió el desarrollo de color de la HRP por medio de un medidor de absorbancia. Como placa de control, se empleó una placa inmovilizada con BSA. La Fig. 4 muestra los resultados.

Los antisueros Nº 10 y 11 obtenidos por inmunización únicamente con el antígeno F y el anticuerpo HAS que empleaba fosfocolina como epítipo reaccionaban ambos con el antígeno de los neumococos rotos y el antígeno de *Haemophilus influenzae* roto. Por el contrario, los antisueros Nº 1 a 9, producidos por inmunización con un antígeno copulado, no exhibían reactividad cruzada con *Haemophilus influenzae*, lo que indica una gran especificidad hacia los neumococos, aunque sólo el antisuero Nº 8 exhibía una débil reactividad cruzada. Por lo tanto, se sugiere que los anticuerpos producidos a partir de un antígeno preparado por entrecruzamiento del antígeno F con una proteína de soporte como inmunógeno, no teniendo dichos anticuerpos reactividad cruzada con *Haemophilus influenzae*, la cual sí la tiene el anticuerpo HAS, son anticuerpos antiantígeno F que no reconocen la fosfocolina. Por el contrario, los antisueros producidos a partir del antígeno F no copulado con una proteína de soporte como inmunógeno

resultaron contener un anticuerpo que tiene fosforilcolina como epítipo, el cual es similar al anticuerpo HAS.

2) Comparación de la reactividad cruzada entre una pluralidad de especies bacterianas

5 Se investigó también la reactividad cruzada entre muchas especies bacterianas. Se repitió el procedimiento del Ejemplo 5-1), excepto por utilizar las bacterias enumeradas en la Tabla 1, para valorar así la reactividad del anticuerpo de la presente invención. La Fig. 5 muestra los resultados. El anticuerpo de la presente invención exhibía reactividad cruzada con *S. mitis*, de forma similar al caso del anticuerpo producido por Stuertz *et al.* (Stuertz *et al.*, J. Clin. Microbiol. 36: 2346-2348 (1998)), pero no exhibía reactividad con otras bacteria.

10

[Tabla 1]

	ATCC Nº	Bacterias	Concentración bacteriana en el extracto (UFC/ml)
1	25285	<i>Bacteroides fragilis</i>	1,1E+07
2	BAA-589	<i>Bordetelia pertussis</i>	9,5E+07
3	66396	<i>Candida albicans</i>	6,0E+06
4	10700	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	5,0E+07
5	14116	<i>Cryptococcus neoformans</i>	4,3E+05
6	8486	<i>Eubacterium limosum</i>	1,3E+07
7	9006	<i>Haemophilus influenzae, a</i>	2,7E+06
8	10211	<i>Haemophilus influenzae, b</i>	5,0E+06
9	9007	<i>Haemophilus influenzae, c</i>	3,9E+06
10	9008	<i>Haemophilus influenzae, d</i>	5,0E+06
11	8142	<i>Haemophilus influenzae, e</i>	4,5E+06
12	700222	<i>Haemophilus influenzae, f</i>	3,4E+06
13	7901	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5,5E+07
14	9997	<i>Klebsilla pneumoniae</i>	3,6E+07
15	33152	<i>Legionella pneumophila</i>	3,6E+07
16	33153	<i>Legionella pneumophila</i>	9,5E+07
17	33216	<i>Legionella pneumophila</i>	1,0E+07
18	33270	<i>Micromonas micros</i>	4,1E+07
19	8193	<i>Moraxella catarrhalis</i>	5,0E+06
20	62501	<i>Neisseria meningitidis</i>	1,6E+07
21	15032	<i>Prebotella intermedia</i>	5,5E+07
22	25845	<i>Prebotella melaninogenica</i>	5,0E+07
23	9027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,5E+07
24	700699	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,7E+07
25	14776	<i>Staphylococcus aureus</i>	5,5E+07
26	33397	<i>Streptococcus anginosus</i> (grupo G)	3,3E+07
27	12386	<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B)	4,1E+07
28	27513	<i>Streptococcus constellaus</i>	3,3E+07
29	27823	<i>Streptococcus constellaus</i>	1,2E+06
30	9528	<i>Streptococcus equi</i> (grupo C)	5,0E+06
31	9895	<i>Streptococcus intermedius</i>	7,0E+07
32	27335	<i>Streptococcus intermedius</i>	3,2E+07
33	49456	<i>Streptococcus mitis</i>	1,2E+07
34	35037	<i>Streptococcus oralis</i> (grupo A)	7,0E+05
35	49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,2E+07
36	10556	<i>Streptococcus sanguis</i>	6,0E+07
37	9963	<i>Streptococcus sp.</i> (grupo F)	4,4E+07
38	8149	<i>Haemophilus influenzae, sin tipo</i>	1,1E+07

15 El anticuerpo antiantígeno F de la presente invención, que reconoce un resto de polisacárido, exhibía una gran especificidad hacia el neumococo, en comparación con los anticuerpos antiantígeno F convencionales que emplean fosforilcolina como epítipo. Además, como el anticuerpo antiantígeno F de la presente invención no tiene reactividad hacia *Haemophilus influenzae*, que causa fácilmente una infección mixta con el neumococo en marcos clínicos, el anticuerpo de la invención es útil en pruebas clínicas sin sufrir interferencias por *Haemophilus influenzae*. Además, el sistema de ensayo ELISA que emplea el anticuerpo de la presente invención exhibía una sensibilidad de 0,041 a 20 10 ng/ml (mostrado en el Ejemplo 3), la cual es notablemente superior (aproximadamente 75 veces) en comparación

con las sensibilidades convencionalmente reportadas de los sistemas de ensayo ELISA (v.g., de 3,1 a 50 ng/ml, reportado por los antes mencionados Stuertz *et al.*).

### 5 Ejemplo de referencia 2: Medios inmunocromatográficos

En la presente invención, se puede llevar a cabo una inmunocromatografía por una técnica convencional. Por ejemplo, se pueden emplear medios cromatográficos, incluyendo tiras y otros materiales, según se muestra en la Fig. 6. Una realización de los medios cromatográficos tiene, en un lado del sustrato, tal como una lámina base de plástico en un extremo, una porción de aplicación de muestra (almohadilla de muestra) y una porción que mantiene un anticuerpo antiantígeno F marcado en estado seco (almohadilla de conjugado), una porción de nitrocelulosa y una porción para absorber el exceso de cantidad de la muestra (almohadilla de absorción). En caso de que la solución de anticuerpo antiantígeno F marcado y una muestra sean absorbidas por la almohadilla de muestra, se puede omitir la almohadilla de conjugado. La almohadilla de muestra, la almohadilla de conjugado y la almohadilla de absorción están preferiblemente formadas por fibra de vidrio, celulosa, algodón o un material poroso formado por una mezcla de éstos (v.g., papel de filtro). Se prefiere nitrocelulosa con un tamaño de poro de 1,0 a 20  $\mu\text{m}$  (preferiblemente de 5,0 a 15,0  $\mu\text{m}$ ).

Sobre la porción de nitrocelulosa, se aplica el anticuerpo policlonal antiantígeno F purificado antes mencionado (concentración: de 0,1 a 10 mg/ml, preferiblemente de 0,2 a 5 mg/ml) (véase la línea de ensayo). Sobre el área apartada de la línea de ensayo, por ejemplo, se aplica una IgG de cabra o de ratón que tiene actividad anti-IgG de conejo (concentración: de 0,1 a 10 mg/ml) (véase la línea de control). Después de secar, se bloquea el medio cromatográfico con proteína, polímero, etc. Como ejemplos del material de bloqueo que puede ser utilizado en la invención, se incluyen proteínas, tales como leche desnatada, BSA, caseína y gelatina, y polímeros, tales como alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG).

El material marcador del anticuerpo es preferiblemente oro coloidal con un tamaño de partícula de 20 a 150 nm (preferiblemente de 30 a 100 nm). Como alternativa, se pueden emplear también partículas de látex coloreadas y otros metales coloidales. Estos materiales de marcaje se unen a un anticuerpo por adsorción directa de los mismos sobre partículas de coloides o de látex, unión covalente a través de otra proteína, unión covalente a través de grupos funcionales sobre las partículas de látex u otro método apropiado. De forma similar al caso de la nitrocelulosa, se puede bloquear el material de marcaje usando proteínas, tales como leche desnatada, BSA, caseína y gelatina, y polímeros, tales como alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG). Se impregna entonces el material poroso antes mencionado con el anticuerpo policlonal antiantígeno F marcado producido por el método antes mencionado y una proteína, tal como leche desnatada, BSA, caseína o gelatina, o un polímero tal como PVA, PVP o PEG, y un sacárido, y se seca, para obtener así una almohadilla de conjugado. La almohadilla de conjugado, una almohadilla de muestra, una almohadilla de absorción y la porción de nitrocelulosa formadas mediante el método anterior se apilan sobre el sustrato, para fabricar así una tira inmunocromatográfica. Se puede usar la tira, cuando está dentro de un estuche de plástico o tiene un sello laminado unido a la misma (Figs. 6C y 6D).

### 40 Ejemplo 6: Evaluación del rendimiento de la inmunocromatografía en sándwich empleando anticuerpos antiantígeno F

Se fabricó una tira inmunocromatográfica que tenía una almohadilla de conjugado que albergaba un anticuerpo antiantígeno F marcado con oro coloidal en estado seco. Se diluyó una muestra, tal como un exudado, un frotis, un esputo, sangre, líquido cefalorraquídeo u orina con origen en otitis media, neumonía, meningitis, etc., con un tampón fosfato que contenía surfactante o similar. Se sumergió una tira cromatográfica en la muestra diluida (extracto de muestra), para revelar así la muestra (Fig. 7A). A los quince minutos de iniciar el revelado, se comprobó visualmente si la muestra era positiva o negativa. Como resultado, se observó una línea roja en la posición de la línea de ensayo cuando la concentración de antígeno F cayó dentro del rango de 10 a 0,6 ng/ml, con lo que se confirmó que la muestra era positiva. Por el contrario, en caso de usar un tampón en lugar del antígeno F, no se observó ninguna línea roja en la posición de la línea de ensayo, con lo que se confirmó que la muestra era negativa (Fig. 7B). Mediante la misma técnica, se estudió un extracto bacteriano que tenía una concentración celular conocida por medio de la misma tira inmunocromatográfica. Cuando sólo se aplicó tampón (concentración celular: 0), no se observó ninguna línea en la posición de la línea de ensayo, lo cual era similar al caso anterior. Por el contrario, cuando se aplicó un extracto de neumococos, la línea de ensayo pudo confirmar una concentración celular de  $10^3$  UFC/ml, lo que indica que la muestra era positiva (Fig. 7C).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo que se obtiene por inmunización con antígeno F neumocócico copulado con una proteína de soporte seleccionada entre seroalbúmina bovina, hemocianina de lapa, ovalbúmina y un extracto de *Ascaris*, **caracterizado por que** el anticuerpo reconoce específicamente un antígeno F neumocócico, donde el anticuerpo no tiene reactividad cruzada con *Haemophilus influenzae* y no exhibe reactividad cruzada con un antígeno C-ps neumocócico.
- 10 2. El anticuerpo según la reivindicación 1, donde se copula dicho antígeno F neumocócico con dicha proteína de soporte usando, como agente entrecruzante, un reactivo de reacción divalente hetero que entrecruza un grupo SH y un grupo amino.
- 15 3. El anticuerpo según la reivindicación 2, donde dicho reactivo de reacción es m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, N-(4-maleimidobutiriloxi)succinimida, N-(6-maleimidocaproiloxi)succinimida, N-(8-maleimidocapriloxi)succinimida, N-(11-maleimidoundecanoiloxi)succinimida, N-((4-(2-maleimidoetoxi)succinil)oxi)succinimida, N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida, N-(4-maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida, N-(6-maleimidocaproiloxi)sulfosuccinimida, N-(8-maleimidocapriloxi)sulfosuccinimida, N-(11-maleimidoundecanoiloxi)sulfosuccinimida o sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato.
- 20 4. Un método para detectar o cuantificar un antígeno neumocócico, consistente en detectar o cuantificar un antígeno F neumocócico en una muestra derivada de un organismo vivo mediante un ensayo inmunológico que emplea un anticuerpo según se indica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 5. El método según la reivindicación 4, donde la muestra derivada de un organismo vivo deriva del oído medio o del seno paranasal.
- 30 6. Un kit para detectar un antígeno neumocócico, conteniendo el kit un anticuerpo como se indica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. El kit según la reivindicación 6, para llevar a cabo el método indicado en la reivindicación 4.

Fig. 1

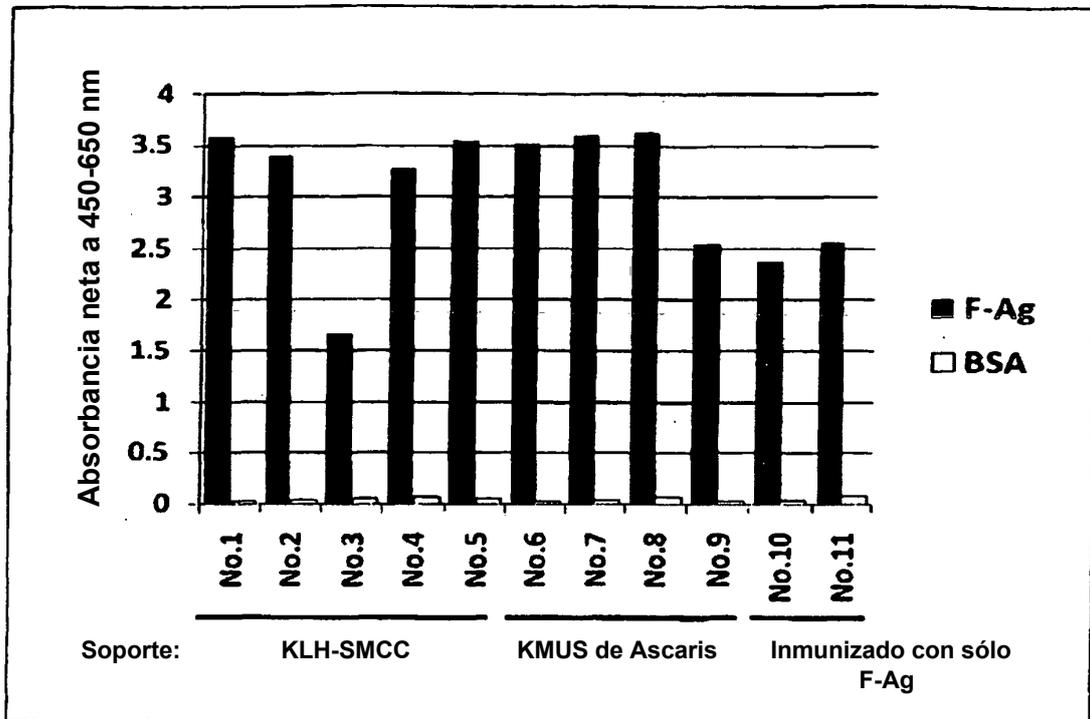


Fig. 2

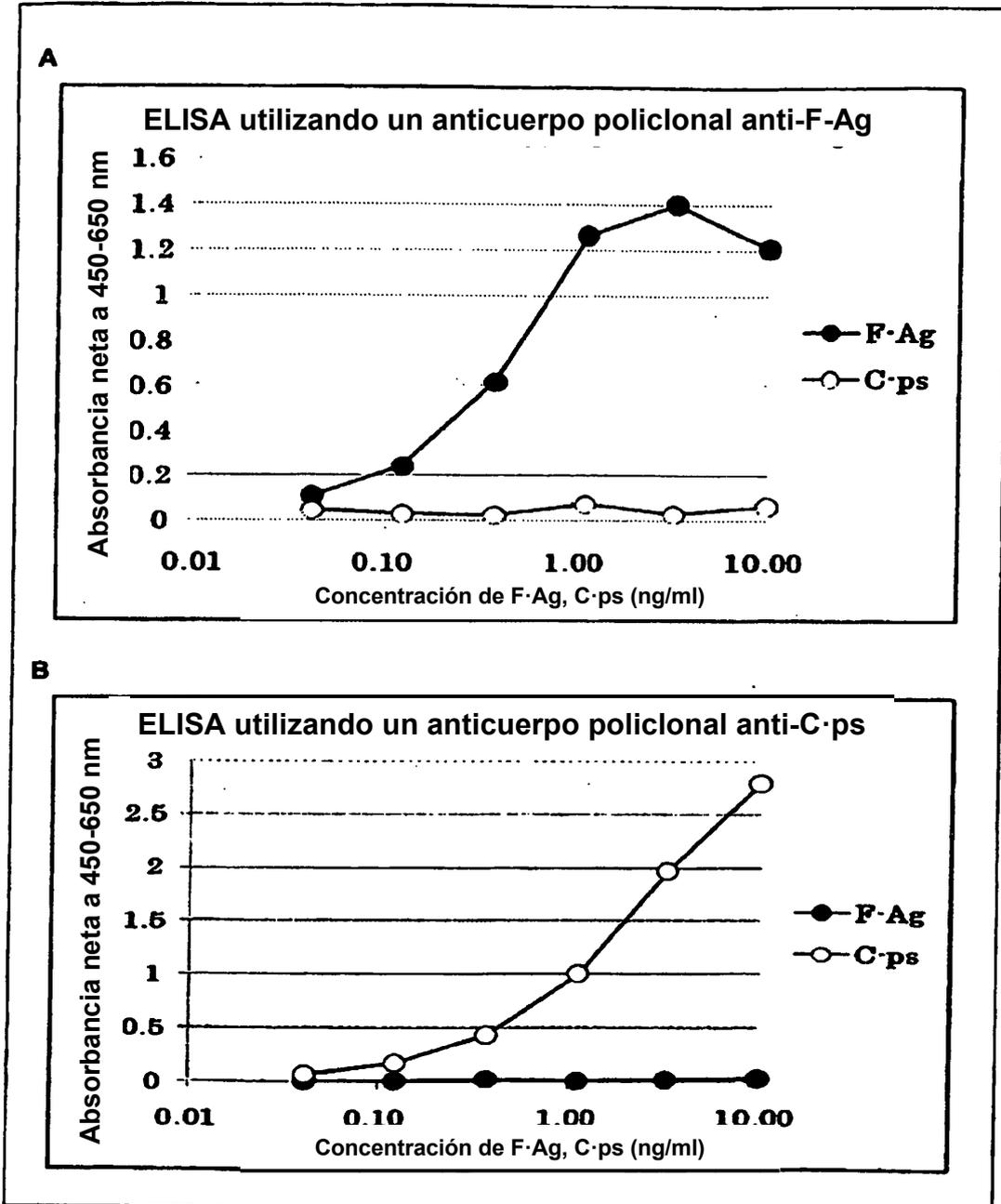


Fig. 3

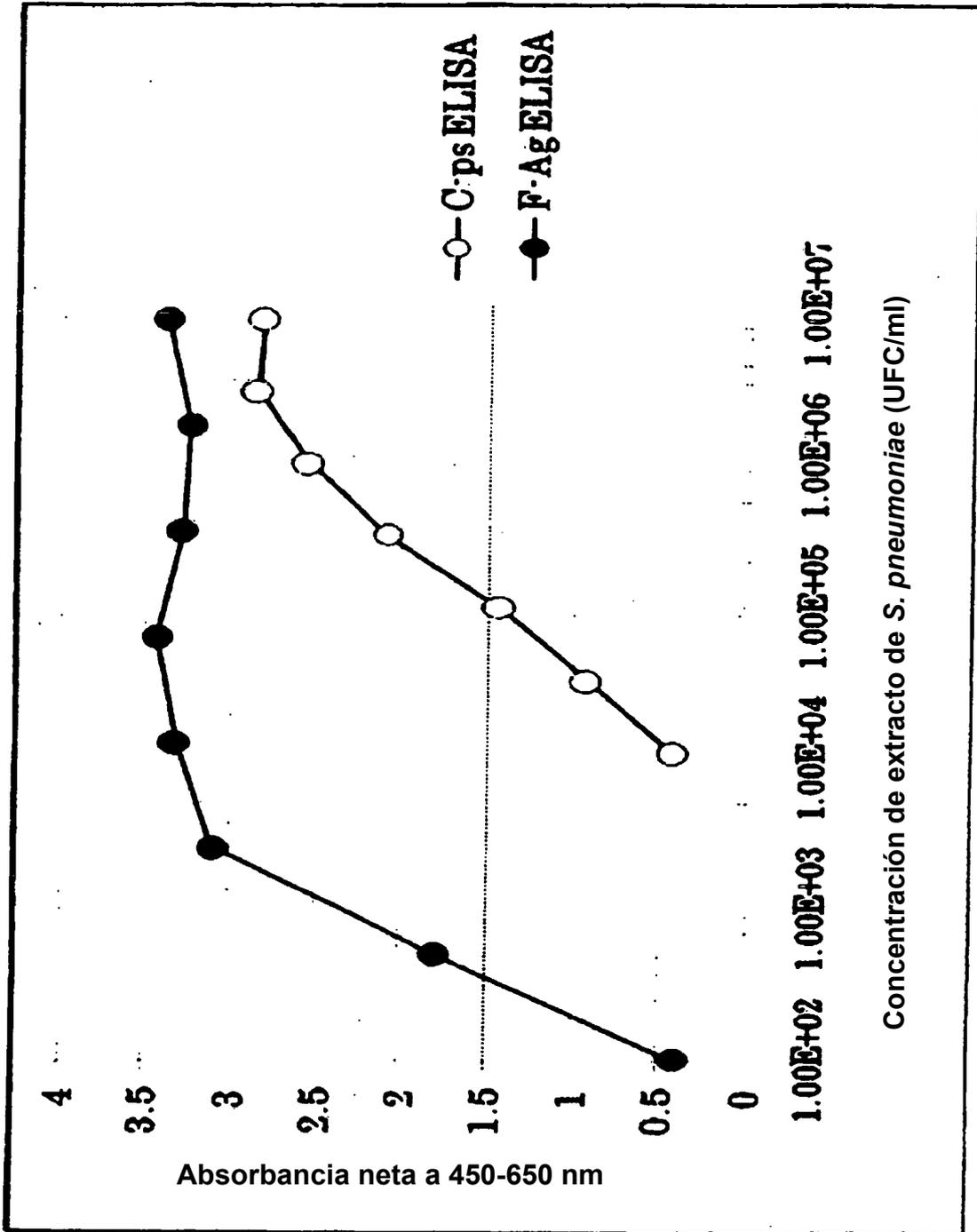


Fig. 4

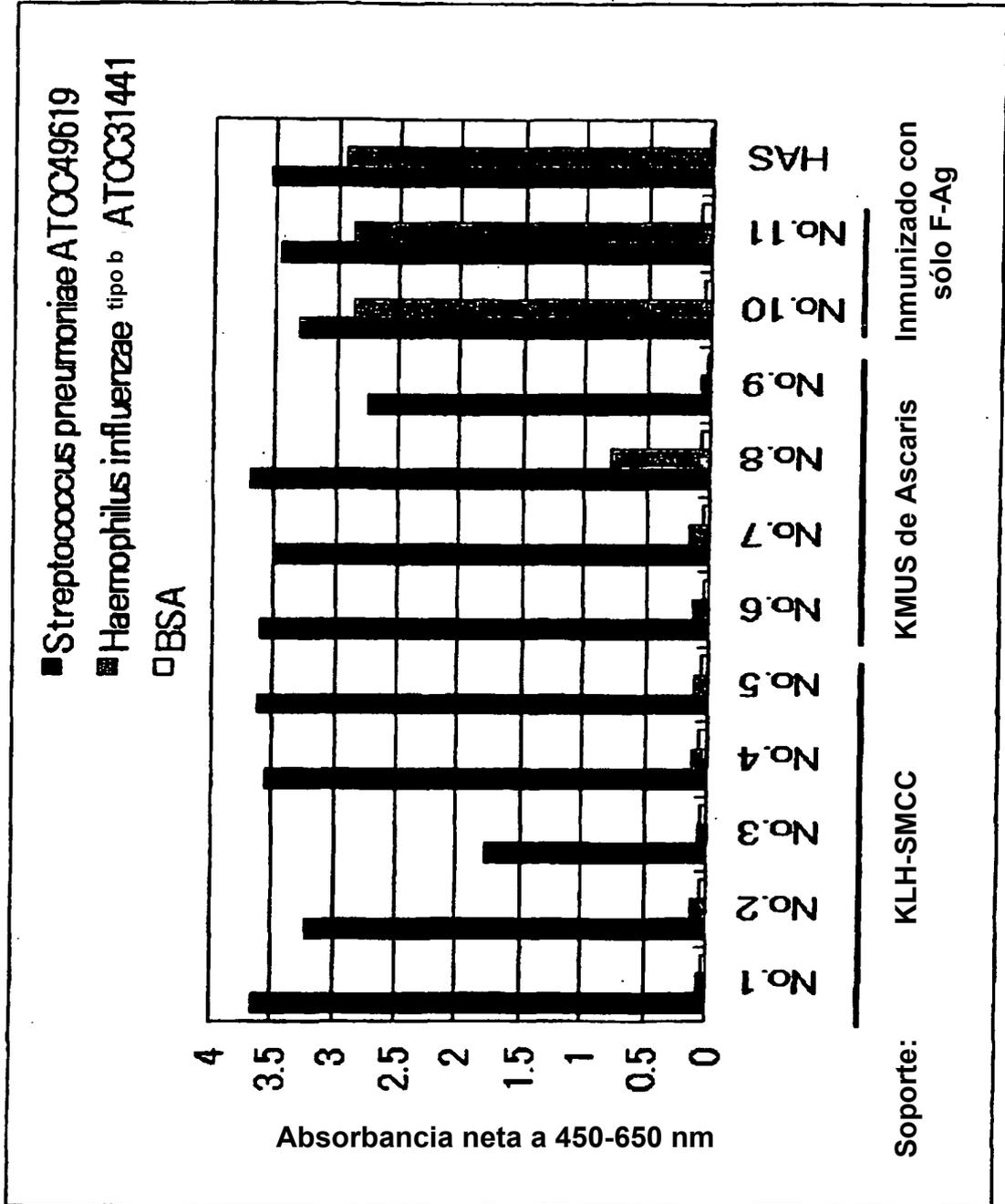


Fig. 5

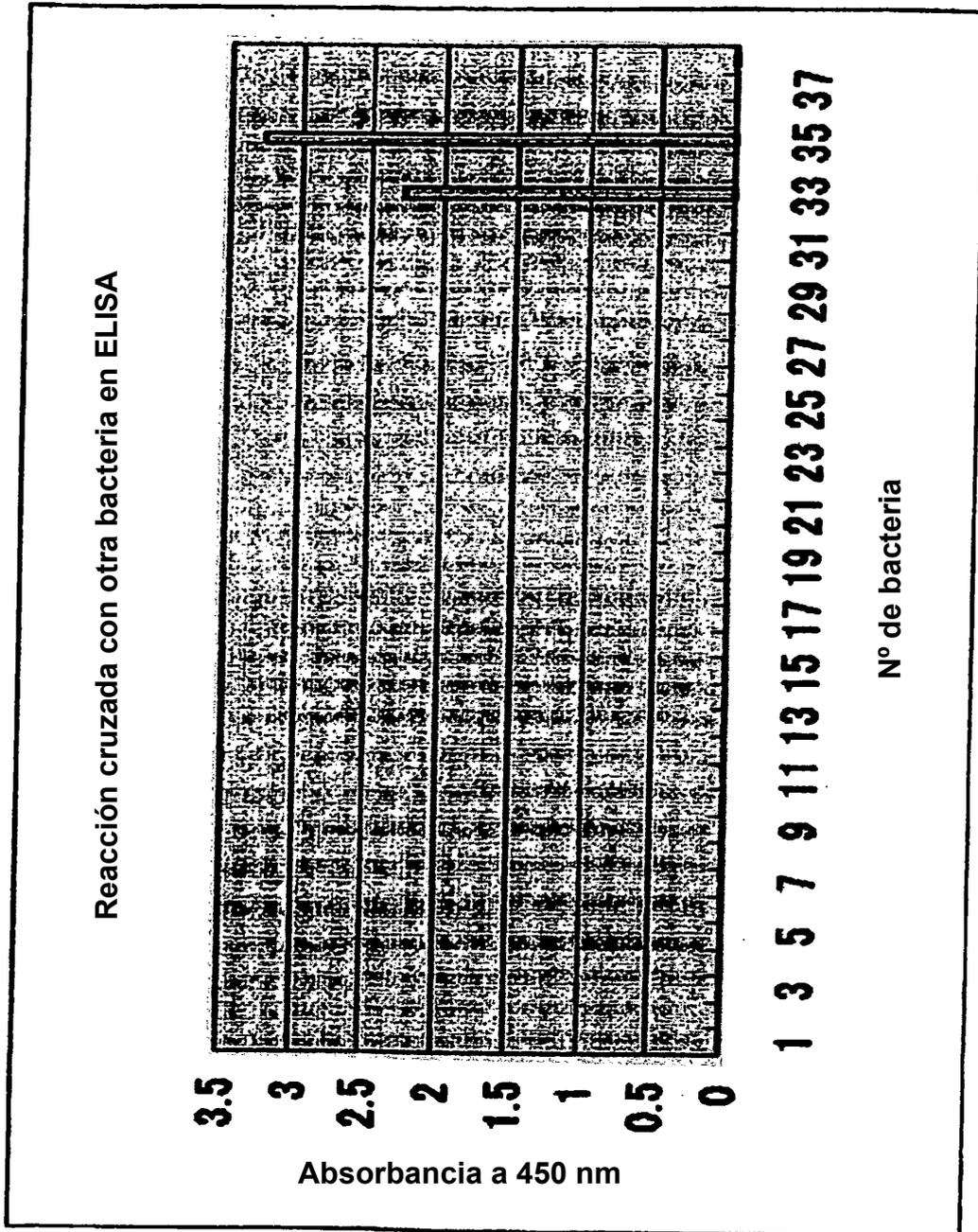


Fig. 6

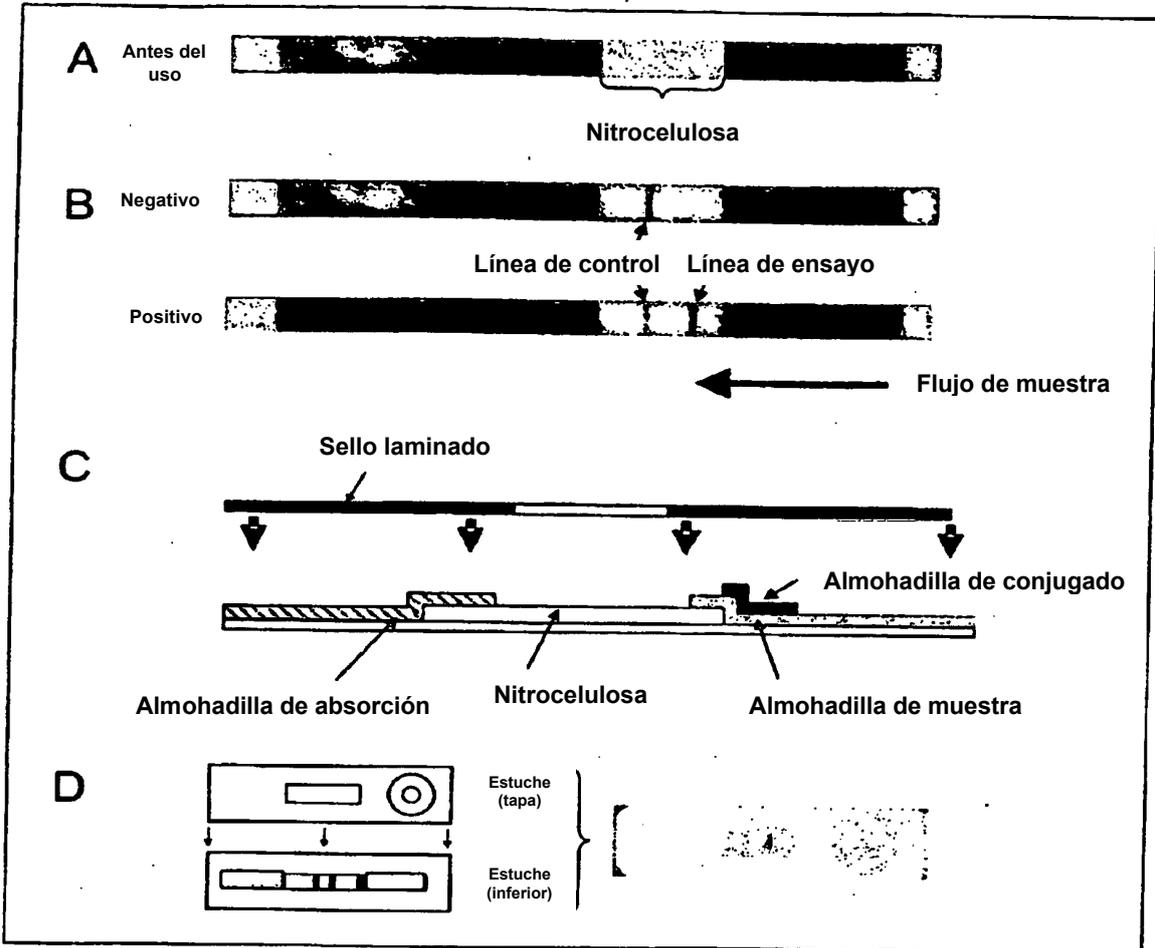


Fig. 7

