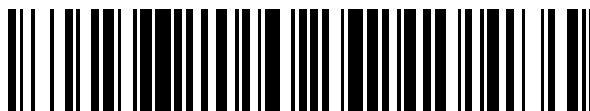


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 303**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2013 PCT/EP2013/061175**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13178737**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013 E 13725711 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2856163**

54 Título: **Método para diagnosticar y diferenciar las infecciones por el VIH-2**

30 Prioridad:

**30.05.2012 EP 12305596**

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

**05.01.2017**

73 Titular/es:

**BIO-RAD INNOVATIONS (100.0%)  
3, Boulevard Raymond Poincaré  
92430 Marnes-La-Coquette, FR**

72 Inventor/es:

**CHAUMAT, PIERRE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 596 303 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 diagnosticar y diferenciar las infecciones por el VIH-2

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de los inmunoensayos y, en particular, a métodos para diagnosticar y diferenciar las infecciones por el VIH, en particular las infecciones por el VIH-2.

**Antecedentes de la invención**

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) es responsable de la mayoría de los casos de infección por VIH y el SIDA en todo el mundo. Se creía que era el único agente causante hasta 1986, cuando se aisló un segundo tipo de VIH, a saber, el VIH tipo 2 (VIH-2).

10 El VIH-2 se limita principalmente al África Occidental pero se han realizado publicaciones esporádicas de infecciones de VIH-2 en varios países fuera de esta área, tales como, por ejemplo, en Portugal, Francia, Mozambique, Angola, India y Brasil. Sin embargo, debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos frente a las proteínas de VIH-1 y VIH-2, los pacientes con infección por VIH-2 pueden recibir un diagnóstico de infección por VIH-1 y es probable que el número de infecciones por VIH-2 en todo el mundo sea en gran medida subestimado.

15 Los VIH-1 y VIH-2 son un 50% similares a nivel genético con aproximadamente un 60% de homología en genes conservados, tales como gag y pol, y alrededor de 39 a 45% de homología en los genes de la envoltura (Guyader et al., 1987). Comparten muchas características, tales como la ruta de transmisión o los tipos de células infectadas, pero también mantienen algunas características distintas.

20 Aunque el VIH-2 es menos transmisible que el VIH-1 y causa infecciones que progresan más lentamente, puede también conducir a la inmunosupresión y al SIDA clínico. La identificación correcta de la infección por VIH-2 es importante debido al control clínico y los regímenes de tratamiento difieren para las infecciones por VIH-1 y VIH-2. De hecho, algunos fármacos antirretrovirales, tales como los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos y algunos inhibidores de la proteasa, tienen una eficacia reducida en el tratamiento de la infección por VIH-2 (Ntemgwa et al, 2009).

25 El procedimiento estándar para el diagnóstico de laboratorio de la infección por VIH por lo general consiste en realizar un inmunoensayo de anticuerpos del VIH (un ensayo inmunoenzimático de una enzima de tercera o cuarta generación (EIA) o una prueba simple rápida) que, si son reactivos, es seguido por pruebas de confirmación (Western blot o ensayo de inmunofluorescencia). El Western-blot (WB) o inmunoblot es la prueba de confirmación más ampliamente utilizada. Sin embargo, estas pruebas son costosas, consumen mucho tiempo y pueden dar resultados indeterminados debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos VIH-2 frente a las proteínas de VIH-1. Sobre la base de la disponibilidad de nuevas pruebas de VIH, un nuevo algoritmo fue propuesto en 2010 en los EE.UU. para sustituir este procedimiento estándar (Pandori y Branson, 2010). Este algoritmo incluye un inmunoensayo HIV-1/2 muy sensible tal como un EIA de tercera o cuarta generación, que, si es reactivo, es seguido por un inmunoensayo de diferenciación de VIH-1/VIH-2 altamente específico. Las muestras que son reactivas para los anticuerpos en ambas pruebas se consideraron positivas, ya sea para los anticuerpos del VIH-1 como del VIH-2. Las muestras negativas para el anticuerpo en la segunda prueba serían entonces puestos a prueba con una prueba de amplificación de ácido nucleico (Delaney et al., 2011). Este nuevo algoritmo fue probado y se ha demostrado que supera el algoritmo anterior porque era más sensible para la detección de la infección por VIH-1, a condición de un gran número de resultados definitivos y de que se detecte el VIH-2 de manera más eficiente (Styer et al., 2011).

40 Hasta la fecha, varios ensayos están disponibles para diferenciar las infecciones del VIH-1 y VIH-2, tales como, por ejemplo, Multispot<sup>®</sup> VIH-1/VIH-2 Prueba Rápida (Bio-Rad Laboratories), Recombigen<sup>®</sup> VIH-1/VIH-2 prueba de RTD (Cambridge Biotech), Pepti-LAV<sup>®</sup> 1-2 ensayo (Bio-Rad Laboratories), INNO-LIA<sup>®</sup> prueba de confirmación del VIH (Innogenetics) o Immunocomb<sup>®</sup> prueba BiSpot II VIH 1 y 2 (Organics). El ensayo de puntuación INNO-LIA VIH I/II ha sido aprobado para su uso diagnóstico en la Unión Europea, pero actualmente no puede ser utilizado en los EE.UU.

45 Hasta la fecha, sólo un ensayo que es capaz de diferenciar las infecciones del VIH-1 y VIH-2 ha sido aprobado por la FDA, a saber, el Multispot<sup>®</sup> VIH-1/VIH-2 Prueba Rápida (Bio-Rad Laboratories). Esta prueba de flujo continuo diferencia los anticuerpos del VIH-1 y VIH-2 mediante el uso de un péptido sintético que representa el epitopo inmunodominante de la glicoproteína de la envoltura del virus gp36 del VIH-2, una glicoproteína de la envoltura de gp41 recombinante (VIH-1) y un péptido sintético que representa el epitopo inmunodominante de la glicoproteína de la envoltura del virus gp41 del VIH-1. Sin embargo, con estos ensayos, una proporción significativa de especímenes permanecen indiferenciadas. Además, el ensayo Multispot<sup>®</sup> a menudo requiere una dilución propensa a errores y lleva mucho tiempo.

55 Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de una prueba de diagnóstico sencilla, rápida y rentable que proporcione resultados altamente sensibles y específicos para diferenciar la reactividad cruzada de VIH-1/VIH-2 de la verdadera reactividad del VIH-2 y que reduzca de este modo el porcentaje de muestras indeterminadas. Esta prueba debe ser adecuada para su uso en algoritmos de múltiples prueba diseñados para la validación estadística de los resultados de la prueba rápida del VIH.

**Sumario de la invención**

- Los inventores han demostrado en este documento que la reactividad de los anticuerpos presentes en una muestra y capaces de unirse al antígeno de la envoltura del VIH-1 inmovilizado en el soporte sólido de un dispositivo de inmunoensayo se puede utilizar para diferenciar las reactividades cruzadas de VIH-1/VIH-2 de las reactividades verdaderas del VIH-2. Así, la presente invención proporciona un nuevo método para la interpretación de los resultados de inmunoensayo y reduce el porcentaje de muestras no diferenciadas.
- En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la diferenciación de la infección con el VIH-2 de la infección con VIH-1 y VIH-2 en un sujeto sospechoso de ser ya sea VIH-2 positivo o VIH-1/VIH-2 positivo, que comprende
- (a) poner en contacto una muestra de fluido del sujeto con al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1 y un reactivo de control que se puede unir a inmunoglobulinas humanas, en el que dicho antígeno y dicho reactivo de control se inmovilizan en sitios distintos sobre un soporte sólido, durante un tiempo y en condiciones que permitan la formación de complejos entre los anticuerpos presentes en la muestra y (i) dicho antígeno de VIH-1 y (ii) dicho reactivo de control;
- (b) detectar la formación de dichos complejos utilizando un sistema de generación de señal cuantificable;
- (c) normalizar la intensidad de la señal obtenida para dicho al menos uno antígeno de envoltura de VIH-1 mediante la división por la intensidad de la señal obtenida para el reactivo de control obteniendo de este modo un valor normalizado para dicho al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1;
- (d) si se utilizan varios antígenos de la envoltura del VIH-1, calcular opcionalmente el valor medio de los valores normalizados para los antígenos de la envoltura del VIH-1;
- en el que un valor normalizado o medio para el antígeno o antígenos de la envoltura del VIH-1 inferior a un umbral predeterminado es indicativo de que el sujeto está infectado con el VIH-2 solo.
- La muestra puede ponerse en contacto además con al menos un antígeno de VIH-2, preferiblemente al menos un antígeno de la envoltura del VIH-2.
- Preferiblemente, la muestra de fluido se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero y plasma.
- El soporte sólido puede comprender al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1 seleccionado del grupo que consiste en gp160 recombinante, gp120 y gp41, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp160, gp120 o gp41. También puede comprender al menos un antígeno de VIH-2 seleccionado del grupo que consiste en gp36 recombinante, gp105 y gp140, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp36, gp105 o gp140.
- En particular, en la etapa a), la muestra de fluido puede estar en contacto con gp160 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, o un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp160, preferiblemente gp160 recombinante. En este caso, de acuerdo con una realización particular de la invención, el umbral predeterminado para el valor normalizado para el antígeno gp160 es de aproximadamente 0,3, preferiblemente está entre 0,24 y 0,36, más preferiblemente está entre 0,27 y 0,33 e incluso más preferiblemente está entre 0,28 y 0,32. Opcionalmente, la muestra de fluido puede ponerse en contacto adicionalmente con gp41 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, o un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp41, preferiblemente un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp41. En este caso, de acuerdo con una realización particular de la invención, el umbral predeterminado para el valor medio para los antígenos gp160 y gp41 es de aproximadamente 0,6, preferiblemente está entre 0,48 y 0,72, más preferiblemente está entre 0,54 y 0,66 e incluso más preferiblemente está entre 0,57 y 0,63 o entre 0,58 y 0,62.
- En el presente método, la muestra de fluido también puede ponerse en contacto además con al menos un antígeno del núcleo de VIH-1 y/o al menos un antígeno del pol de VIH-1 inmovilizado sobre el soporte. En particular, la muestra de fluido puede ponerse en contacto además con al menos un antígeno de VIH-1 seleccionado del grupo que consiste en p31 recombinante y p24, un fragmento antigénico del mismo y un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de p31 o p24.
- Preferiblemente, el inmunoensayo es un ensayo de tipo de migración, una prueba de flujo continuo, un ensayo de tira reactiva o un ensayo microfluídico, más preferiblemente un ensayo de tipo de migración. En particular, el ensayo de tipo de migración puede ser un inmunoensayo de doble camino.
- El reactivo de control se puede seleccionar del grupo que consiste en proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L y derivados de los mismos, y un anticuerpo de inmunoglobulina anti-humana. Preferiblemente, el reactivo de control es la proteína A.
- En la etapa (b), el sistema de generación de señal cuantificable puede ser un reactivo capaz de unirse a inmunoglobulinas humanas conjugadas con un marcador detectable. En particular, el reactivo se puede seleccionar

del grupo que consiste en proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L y derivados de los mismos, y un anticuerpo de inmunoglobulina anti-humana. Preferiblemente, el reactivo capaz de unirse a inmunoglobulinas humanas es la proteína A. El marcador detectable puede seleccionarse del grupo que consiste en metales coloidales; coloides no metálicos; carbón; colorantes visibles, fluorescentes, luminiscentes y quimioluminiscentes; partículas magnéticas; elementos radiactivos; y enzimas. En una realización particular, el sistema de generación de señal cuantificable es un conjugado que comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L y derivados de los mismos, junto con un metal coloidal o un colorante fluorescente, luminiscente o luminiscente. En una realización más particular, el sistema de generación de señal cuantificable es la proteína A conjugada con oro coloidal.

## 10 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Representación de un dispositivo de inmunoensayo de VIH-1/2 de camino dual. Figura 1A: Imagen del dispositivo de VIH-1/2 Geenius™ sin cámara alta. Figura 1B: líneas de prueba del VIH-1 y VIH-2 y línea de control del dispositivo de VIH-1/2 Geenius™.

Figura 2: Distribución de los valores medios para las intensidades de banda de gp160 y gp41 normalizadas ((intensidad de la banda gp160 + intensidad de la banda gp41)/intensidad de la banda de control)/2 en muestras del VIH-1 positivo (n = 135) y VIH-2 indiferenciado (103 muestras no diferenciadas sobre un total de 154 muestras positivas de VIH-2) del lote A.

Figura 3: Frecuencias acumuladas de VIH-1 en las muestras positivas (n = 135) y porcentaje de muestras positivas VIH-2 no diferenciadas (103 muestras no diferenciadas sobre un total de 154 muestras positivas VIH-2) del lote A de acuerdo con los valores de umbral para la media de valores para las intensidades de banda de gp160 y gp41 ((intensidad de la banda gp160 + intensidad de la banda gp41)/intensidad de la banda de control)/2).

Figura 4: Frecuencias acumuladas de VIH-1 en las muestras positivas del lote A (n = 135) y del lote B (n = 50) y el porcentaje de muestras positivas de VIH-2 no diferenciadas del lote A (103 muestras no diferenciadas sobre un total de 154 muestras positivas de VIH-2) y el lote B (90 muestras no diferenciadas sobre un total de 132 muestras positivas de VIH-2) de acuerdo con los valores de umbral de los valores medios de las intensidades de las bandas de gp160 y gp41 ((intensidad de la banda gp160 + intensidad de la banda gp41)/intensidad de la banda de control)/2).

Figura 5: Distribución de los valores normalizados de la intensidad de la banda gp160 (intensidad de la banda gp160/intensidad de la banda de control) en muestras positivas del VIH-1 del lote A (n = 135) y del lote B (n = 50) y muestras de VIH-2 indiferenciadas del lote A (103 muestras no diferenciadas en un total de 154 muestras positivas de VIH-2) y B (90 muestras no diferenciadas en un total de 132 muestras positivas de VIH-2).

Figura 6: Frecuencias acumuladas de las muestras positivas de VIH-1 (n = 135) y porcentaje de muestras positivas de VIH-2 no diferenciadas de lote A (103 muestras no diferenciadas sobre un total de 154 muestras positivas de VIH-2) de acuerdo con los valores umbral para los valores normalizados de intensidad de la banda gp160 (intensidad de la banda de gp160/intensidad de la línea de control).

Figura 7: Frecuencias acumuladas de las muestras positivas de VIH-1 (n = 50) y porcentaje de muestras positivas de VIH-2 no diferenciadas del lote B (90 muestras no diferenciadas sobre un total de 132 muestras positivas de VIH-2) de acuerdo con los valores umbral para los valores normalizados de intensidad de la banda gp160 (intensidad de la banda de gp160/intensidad de la línea de control).

Figura 8: Frecuencias acumuladas de muestras VIH-1 positivo (n = 135) y VIH-1/VIH-2 positivo (n = 4) del lote A de acuerdo con los valores umbral para los valores normalizados de la intensidad de la banda gp160 (intensidad de la banda gp160/intensidad de la línea de control).

## Descripción detallada de la invención

Debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos de VIH-2 con los antígenos del VIH-1, diferenciar las infecciones por VIH-2 y las co-infecciones de VIH-1/HIV-2 utilizando un inmunoensayo sigue siendo un reto y a menudo conduce a un porcentaje significativo de muestras indeterminadas.

Los inventores analizaron un panel que comprende un total de 475 muestras positivas de VIH (185 VIH-1, 286 VIH-2 y 4 VIH-1/HIV-2) utilizando un ensayo de tipo migración, en particular, un inmunoensayo de doble trayectoria, diseñado para detectar y discriminar los anticuerpos de VIH-1 y VIH-2 presentes en dichas muestras. En 286 muestras positivas de VIH-2, 193 (67,5%) fueron reactivas con ambos antígenos de VIH-1 y VIH-2 y por lo tanto seguían siendo indiferenciadas.

Con el fin de reducir el porcentaje de muestras indeterminadas, los inventores calcularon la relación de la intensidad de la señal obtenida para los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de la envoltura de VIH-1, en particular, gp160 y/o gp41, frente a la intensidad de la señal del control positivo. Por lo tanto, calcularon, para cada muestra, la relación de la intensidad de la señal obtenida para los complejos entre los anticuerpos presentes en la muestra y los

antígenos de la envoltura del VIH-1 (en particular gp160 y/o gp41) frente a la intensidad de la señal obtenida para los complejos entre los anticuerpos presentes en la muestra y el reactivo de control que une inmunoglobulinas humanas. Encontraron que esta relación podría ser utilizada para diferenciar las reactividades cruzadas del VIH-1/HIV-2 frente a las reactividades verdaderas del VIH-2. Se determinó el valor umbral para esta relación y muestras con una relación inferior a este umbral son considerados como el VIH-2 positivo. Usando este método para interpretar los resultados de prueba, sólo 16 muestras (5,6%) en un total de 286 muestras positivas de VIH-2 se mantuvieron indiferenciadas.

### Definiciones

Tal como se utiliza en este documento, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a un ser humano, incluyendo adultos, niños y seres humanos en la etapa prenatal. Preferiblemente, el estado serológico del VIH [es decir, "VIH negativo" o "VIH positivo"] del sujeto se ha determinado previamente como se describe a continuación. El método de la invención es particularmente adecuado para los sujetos sospechosos de ser ya sea VIH-2 positivo o VIH-1/VIH-2 positivo.

La expresión "sujeto VIH-positivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto que está infectado con un virus de la inmunodeficiencia humana de cualquier tipo. Esta infección puede ser diagnosticada usando cualquier método conocido por el experto en la materia tales como inmunoensayo enzimático, Western-blot o prueba de ácido nucleico. La expresión "VIH-2 positivo", tal como se utiliza en este documento, se refiere a un sujeto que está infectado solamente con el VIH-2, o una muestra de dicho sujeto. La expresión "VIH-1 positivo", tal como se utiliza en este documento, se refiere a un sujeto que está infectado solamente con el VIH-1, o una muestra de dicho sujeto. La expresión "VIH-1/VIH-2 positivo", tal como se utiliza en este documento, se refiere a un sujeto que está infectado por el VIH-1 y VIH-2, o una muestra de dicho sujeto.

La expresión "muestra de fluido", "muestra" o "espécimen", como se usa en este documento, se refiere a cualquier muestra de fluido que comprende los anticuerpos derivados del sujeto, tales como muestras de sangre entera, suero, plasma, saliva, leche, líquido amniótico, orina o fluido seminal. Este término también puede referirse a un fluido de cultivo en el que cualquier preparación de tejido o células del sujeto se ha incubado. Preferiblemente, la muestra de fluido es una muestra de sangre entera, suero o plasma. La muestra puede ser una muestra fresca o congelada. Puede ser utilizada inmediatamente después de la recogida o puede ser almacenada antes de ser probada. En particular, las muestras frescas se pueden almacenar hasta 48 horas a temperatura ambiente (20-30°C) o hasta 7 días a 2-8°C. Para el almacenamiento a largo plazo, las muestras pueden ser congeladas (-20°C o inferior) y descongeladas antes de su uso. La muestra puede ser tratada antes de su uso, tal como la preparación de plasma o suero de la sangre, diluyendo fluidos viscosos, o similares. Preferiblemente, la muestra no es tratada antes de su uso y, en particular, no está inactivada por calor.

La expresión "anticuerpos de reacción cruzada de VIH-1/HIV-2", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que reaccionan con al menos un antígeno de VIH-1 y al menos un antígeno del VIH-2.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "antígeno del VIH" se refiere a un péptido o una proteína que comprende un epítipo que es reconocido por un anticuerpo anti-VIH. En particular, la expresión "antígeno de VIH-1" se refiere al péptido o a la proteína que comprende un epítipo que es reconocida por un anticuerpo dirigido contra una glicoproteína de VIH-1 y la expresión "antígeno del VIH-2" se refiere al péptido o a la proteína que comprende un epítipo que es reconocida por un anticuerpo dirigido contra una proteína o glicoproteína de VIH-2. La expresión "antígeno de la envoltura del VIH-1" se refiere al péptido o a la proteína que comprende un epítipo que es reconocida por un anticuerpo dirigido contra una glicoproteína de la envoltura del VIH-1 y la expresión "antígeno de la envoltura del VIH-2" se refiere al péptido o a la proteína que comprende un epítipo que es reconocida por un anticuerpo dirigido contra una proteína o glicoproteína de la envoltura del VIH-2. El antígeno puede ser producido por proceso químico, por recombinación genética, o puede purificarse a partir de una muestra biológica.

En una realización particular, el antígeno del VIH se selecciona del grupo que consiste en una proteína recombinante, sintética o purificada del virus del VIH, o cualquier fragmento antigénico de la misma. La expresión "fragmento antigénico" se entiende que significa un fragmento de una proteína o glicoproteína que es capaz de ser reconocida por anticuerpos dirigidos contra dicha proteína o glicoproteína, y que permite una afinidad de unión con esta última. Preferiblemente, el fragmento antigénico tiene un tamaño de al menos 7 restos de aminoácidos. Más preferiblemente, el fragmento antigénico tiene un tamaño en el intervalo de 7 a 40 restos de aminoácidos. Incluso más preferiblemente, dicho fragmento antigénico comprende un epítipo inmunodominante.

Una "proteína recombinante" significa un polipéptido producido mediante la expresión en un sistema de expresión recombinante tal como, por ejemplo, líneas celulares humanas transfectadas con un vector de expresión que codifica el polipéptido de interés. Las proteínas recombinantes del VIH pueden ser expresadas en diversas células huésped, tales como, por ejemplo, bacterias (por ejemplo, E. coli), células humanas, de levadura o células de insecto (utilizando un sistema de expresión de baculovirus (Arora y Seth, 2003)).

Una "proteína sintética" significa una forma polimérica de aminoácidos de una longitud cualquiera que puede sintetizarse químicamente usando métodos bien conocidos.

Una "proteína purificada" significa un polipéptido de origen natural purificado a partir de sobrenadantes de células infectadas por el VIH o una proteína recombinante purificada a partir de los sobrenadantes de células transfectadas con un vector de expresión que codifica el polipéptido de interés. Este polipéptido está esencialmente libre de componentes celulares con el que está asociado de forma natural. En particular, el polipéptido purificado está libre de cualquier componente, que podría interactuar de forma no específica con los anticuerpos del VIH y dar lugar a resultados falsos positivos o negativos. Los métodos de purificación de proteínas de son bien conocidos en la técnica.

La expresión "reactivo de control", como se usa en este documento, se refiere a un reactivo que puede unir inmunoglobulinas humanas de la muestra, en particular anticuerpos del VIH y no del VIH, con el fin de determinar la validez del ensayo. Preferiblemente, el reactivo de control se puede unir a la región Fc de las inmunoglobulinas humanas, en particular la IgG humana. Los ejemplos del compuesto que puede usarse como reactivo de control incluyen, pero no se limitan a, proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L, y sus derivados; o un anticuerpo de inmunoglobulina anti-humano, preferiblemente un anticuerpo dirigido contra la región Fc de las inmunoglobulinas humanas. En una realización particular, el reactivo de control es la proteína A.

El término "conjugado", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto diseñado para unirse a un analito de interés, en particular una inmunoglobulina humana, y para producir una señal detectable. El conjugado comprende típicamente un miembro de unión específica conjugado con un marcador.

La expresión "epítipo inmunodominante" se refiere a una región altamente conservada y/o altamente inmunogénica de una proteína o glicoproteína. Debido a extensos estudios, numerosos epítipos inmunodominantes de proteínas y glicoproteínas del VIH son bien conocidos (véase, por ejemplo Robinson et al, 1990; Xu et al, 1991; Barin et al, 1996; Tomaras et al., 2008; Penn-Nicholson et al, 2008; Benjouad et al, 1993; Espejo y Uribe, 1990). El experto en la materia puede, por tanto, diseñar fácilmente péptidos que comprenden un epítipo inmunodominante adecuado para su uso en la presente invención. Los péptidos utilizados en la presente invención pueden comprender uno o varios epítipos inmunodominantes.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores de  $\pm 20\%$  del valor especificado. Por ejemplo, "aproximadamente 20" incluye  $\pm 20\%$  de 20, o del 16 al 24. Más preferiblemente, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores de  $\pm 10\%$  del valor especificado, incluso más preferiblemente, un intervalo de valores  $\pm 5\%$  o  $\pm 3\%$  del valor especificado.

Por "al menos uno", se entiende en el presente documento uno o varios.

Por "varios", se entiende en el presente documento dos, tres o más de tres, preferiblemente dos.

Los métodos de la invención, como se describen a continuación, están preferiblemente en métodos in vitro.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la diferenciación de la infección con el VIH-2 de la infección con VIH-1 y VIH-2 en un sujeto sospechoso de ser ya sea VIH-2 positivo o VIH-1/VIH-2 positivo, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de fluido del sujeto con al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1 y un reactivo de control que puede unir inmunoglobulinas humanas, en el que dicho antígeno y dicho reactivo de control se inmovilizan en sitios distintos sobre un soporte sólido, por un tiempo y en condiciones que permitan la formación de complejos entre los anticuerpos presentes en la muestra y (i) dicho antígeno de VIH-1 y (ii) dicho reactivo de control;

(b) detectar la formación de dichos complejos utilizando un sistema de generación de señal cuantificable;

(c) normalizar la intensidad de la señal obtenida para dicho al menos un antígeno de envoltura de VIH-1 mediante la división por la intensidad de la señal obtenida para el reactivo de control obteniendo de este modo un valor normalizado para dicho al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1;

(d) si se utilizan varios antígenos de la envoltura de VIH-1, calcular opcionalmente el valor medio de los valores normalizados para los antígenos de la envoltura del VIH-1;

en el que un valor normalizado o media para el antígeno o los antígenos de la envoltura del VIH-1 inferior a un umbral predeterminado es indicativo de que el sujeto está infectado con el VIH-2 solo.

Un valor normalizado o medio para el antígeno o los antígenos de la envoltura del VIH-1 superior a un umbral predeterminado es indicativo de que el sujeto está infectado con el VIH-1 y VIH-2, o que, para este sujeto, se necesita al menos una prueba adicional para discriminar la reactividad cruzada de VIH-1/VIH-2 de la verdadera reactividad de VIH-2.

El dispositivo de inmunoensayo usado en el método de la invención es un dispositivo de inmunoensayo en fase sólida que incorpora un soporte sólido al que se unen los antígenos del VIH y el reactivo de control. El soporte sólido

puede ser de cualquier forma, tal como una placa, un tubo o una perla, y numerosos materiales adecuados se pueden utilizar tal como nitrocelulosa, nylon, acetato de celulosa, fibras de vidrio, u otros polímeros porosos.

5 En particular, el inmunoensayo puede ser un ensayo de tipo de migración, una prueba de flujo continuo, un ensayo de tira reactiva o un ensayo microfluídico. Preferiblemente, el inmunoensayo es un ensayo de tipo de migración o una prueba de flujo continuo, más preferiblemente, un ensayo de tipo de migración.

10 Un dispositivo del tipo ensayo de migración comprende típicamente una almohadilla de muestra, una almohadilla conjugada, una membrana a la que los antígenos del VIH y el reactivo de control están ligados en sitios distintos (líneas por lo general distintas), una almohadilla absorbente y, opcionalmente, una almohadilla tampón si es diferente de la muestra almohadilla. El dispositivo del tipo ensayo migración puede ser, por ejemplo, una tira de flujo lateral o un dispositivo de inmunoensayo de doble camino como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2006/099191. En una realización preferida, el inmunoensayo es un inmunoensayo de doble camino.

15 Un dispositivo de inmunoensayo de flujo continuo por lo general comprende una membrana o filtro al que los antígenos del VIH y el reactivo de control están ligados en sitios distintos (generalmente puntos distintos), y una almohadilla absorbente. La muestra de líquido se aplica a la membrana y se deja absorber a través por la acción capilar. A continuación se aplica un conjugado para revelar la presencia de anticuerpos contra el VIH. Una etapa o etapas de lavado opcionales pueden realizarse antes y/o después de añadir el conjugado.

20 Un dispositivo de ensayo de tira reactiva comprende típicamente un soporte sólido no poroso sobre el que los antígenos del VIH y el reactivo de control están ligados en sitios distintos (generalmente puntos distintos). Para realizar el ensayo, el dispositivo se sumerge sucesivamente en la muestra de fluido, una solución de lavado, una solución que contiene el conjugado, y, opcionalmente, una segunda solución de lavado.

Un ensayo de microfluidos implica un dispositivo de "laboratorio en un chip", una red de canales de dimensión de micras. El antígeno(s) del VIH y el reactivo(s) de control se pueden inmovilizar sobre la superficie de dichos microcanales (véase por ejemplo Ng et al, 2010; Song et al, 2012).

Todos estos tipos de inmunoensayos son bien conocidos por la persona experta.

25 En la etapa a) del método de la invención la muestra de fluido del sujeto se pone en contacto con al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1 inmovilizado en el soporte sólido del dispositivo de inmunoensayo. Este antígeno de envoltura del VIH-1 puede ser una glicoproteína de la envoltura del VIH-1, o un fragmento antigénico del mismo, o también puede ser un péptido que comprenda un epítipo reconocido por un anticuerpo dirigido contra dicha glicoproteína de la envoltura del VIH-1, en particular, un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de dicha glicoproteína.

30 La glicoproteína de envoltura del VIH-1 puede ser cualquier proteína codificada por el gen env de VIH-1, es decir, el precursor de la glicoproteína de la envoltura gp160, la proteína de la envoltura externa gp120 o la proteína de la envoltura de transmembrana gp41. La glicoproteína puede ser producida por técnicas recombinantes, síntesis química, o ser purificada a partir de muestras biológicas. Preferentemente, la glicoproteína es una proteína recombinante.

35 En una realización, la muestra se pone en contacto con al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1 seleccionado del grupo que consiste en gp160 recombinante, gp120 y gp41, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp160, gp120 o gp41. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto con al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1 seleccionado del grupo que consiste en gp160 recombinante y gp41, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp41 o gp160.

40 En una realización particular, la muestra se pone en contacto con al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1 seleccionado del grupo que consiste en gp160 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp160. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto con gp160 recombinante. Opcionalmente, la muestra puede ponerse en contacto adicionalmente con otro antígeno de la envoltura del VIH-1, preferiblemente un antígeno seleccionado del grupo que consiste en gp41 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp41, más preferiblemente un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp41. En una realización más particular, la muestra se pone en contacto con gp160 recombinante y un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp41.

45 En otra realización particular, la muestra se pone en contacto con al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1 seleccionado del grupo que consiste en gp41 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp41.

50 Opcionalmente, la muestra puede ponerse en contacto además con al menos un otro antígeno de VIH-1 inmovilizado sobre el soporte del dispositivo del inmunoensayo. El antígeno(s) de VIH-1 adicional se puede seleccionar del grupo que consiste en proteínas recombinantes, sintéticas o purificadas codificadas por el gen gag o

- 5 pol del VIH-1 (por ejemplo, p66, p55, p51, p40, p31/34 ("p31"), p24/25 ("p24") o p18), cualquier fragmento antigénico del mismo, y cualquier péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de dichas proteínas. En una realización particular, la muestra se pone en contacto adicionalmente con al menos un antígeno de VIH-1 seleccionado del grupo que consiste en p31 recombinante y p24, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de p31 o p24. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto adicionalmente con un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de p31 y p24 recombinante.
- 10 La muestra puede ponerse también en contacto con al menos un antígeno de VIH-2. El antígeno del VIH-2 puede ser una proteína recombinante, sintética o purificada (o glicoproteína) del VIH-2, o un fragmento antigénico de la misma. El antígeno del VIH-2 también puede ser un péptido que comprenda un epítipo reconocido por un anticuerpo dirigido contra una proteína del VIH-2, en particular un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de dicha proteína.
- 15 En particular, la proteína del VIH-2 se puede seleccionar del grupo que consiste en las proteínas gag (p56, p26 y p16), las proteínas pol (p68 y p34) y las glicoproteínas de la envoltura (gp140, gp105/125 ("gp105") y gp36). Preferiblemente, el antígeno de VIH-2 se elige con el fin de limitar las reacciones cruzadas con anticuerpos de VIH-1.
- 20 En una realización, en la etapa a), la muestra se pone en contacto adicionalmente con al menos un antígeno del VIH-2 seleccionado del grupo que consiste en proteínas recombinantes codificadas por el gen env de VIH-2, es decir, el precursor de la glicoproteína de la envoltura gp140, la proteína de la envoltura externa gp105 y la proteína de la envoltura de transmembrana gp36, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp140, gp105 o gp36. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto adicionalmente con al menos un antígeno del VIH-2 seleccionado del grupo que consiste en gp36 recombinante y gp140, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp36 o gp140.
- 25 En una realización particular, la muestra se pone en contacto adicionalmente con al menos un antígeno del VIH-2 seleccionado del grupo que consiste en gp36 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp36, preferiblemente un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp36. Opcionalmente, la muestra puede ponerse en contacto adicionalmente con otro antígeno de envoltura del VIH-2, preferiblemente un antígeno seleccionado del grupo que consiste en gp140 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp140, más preferiblemente un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp140.
- 30 Las cantidades de VIH-antígeno(s) y reactivo de control inmovilizados en el soporte sólido son fácilmente elegidas por el experto en la materia con el fin de proporcionar la mejor inmunorreactividad.
- El tiempo y las condiciones que permiten la formación de complejos entre los anticuerpos de la muestra y los antígenos/reactivos inmovilizados, dependen del dispositivo de inmunoensayo usado en el método de la invención y son ajustados fácilmente por la persona experta.
- 35 La formación de complejos entre los anticuerpos de la muestra y (i) VIH-antígeno(s) y (ii) el reactivo de control se detecta luego usando un sistema de generación de señal cuantificable. Este sistema se elige con el fin de producir una señal detectable a un nivel o intensidad, con respecto a la cantidad de anticuerpo ligado a cada reactivo/antígeno inmovilizado. Preferiblemente, se utiliza el mismo sistema para generar señales para los complejos antígeno-anticuerpo del VIH y complejos de reactivo de control-anticuerpo.
- 40 Típicamente, el sistema de generación de señal cuantificable comprende un miembro de unión específica conjugado con un compuesto generador de señal. En particular, este sistema puede ser un reactivo capaz de unirse a las inmunoglobulinas humanas, preferiblemente a la región Fc de las inmunoglobulinas humanas, conjugado con un marcador detectable.
- 45 En una realización, el reactivo capaz de unirse a inmunoglobulinas humanas es una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteínas que son capaces de unirse a la región Fc de inmunoglobulinas humanas tales como proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L, y sus derivados, o anticuerpos dirigidos contra las inmunoglobulinas humanas, en particular, anticuerpos dirigidos contra la región Fc de las inmunoglobulinas humanas.
- 50 Si el miembro de unión específica es un anticuerpo, puede ser un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo recombinante, o una mezcla de los mismos. Los detalles de la preparación de tales anticuerpos y su adecuación para uso como miembros de unión específica son bien conocidos para los expertos en la técnica.
- En una realización preferida, el reactivo capaz de unirse a las inmunoglobulinas humanas se selecciona del grupo que consiste en proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L, y sus derivados, preferiblemente es la proteína A.
- 55 El marcador detectable conjugado con el reactivo capaz de unirse a inmunoglobulinas humanas puede ser cualquier compuesto que genere una señal cuantificable, preferiblemente mediante una lectura instrumentada. Los marcadores detectables adecuados pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo que consiste en metales



coloidales tales como oro o plata; coloides no metálicos tales como partículas de selenio, telurio o azufre coloidal; carbón; colorantes visibles, fluorescentes, luminiscentes y quimioluminiscentes; partículas magnéticas; elementos radiactivos; y enzimas.

5 En una realización particular, el sistema de generación de señal cuantificable es un conjugado que comprende una proteína que es capaz de unirse a la región Fc de las inmunoglobulinas humanas, seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L y derivadas de las mismas, junto con un metal coloidal o un colorante fluorescente, luminiscente o quimioluminiscente. En una realización preferida, el sistema de generación de señales cuantificables es un conjugado que comprende la proteína A acoplada con oro coloidal.

10 La intensidad de señal para cada complejo entre los anticuerpos de la muestra y el reactivo/antígeno inmovilizado se puede medir usando un lector instrumentado adecuado, en particular, un lector que sea capaz de capturar y analizar imágenes. La elección del lector instrumentado depende de la naturaleza de la señal emitida por el marcador detectable y el dispositivo de inmunoensayo usado en el presente método.

15 La intensidad de la señal obtenida para el complejo antígeno-anticuerpo del VIH-1 sobre se normaliza dividiendo por la intensidad de la señal obtenida con el complejo reactivo de control-anticuerpo. Si varios antígenos de la envoltura del VIH-1 se inmovilizan sobre el soporte, el valor normalizado de la intensidad de la señal se puede calcular para cada uno de estos antígenos.

20 En una realización, el valor normalizado se calcula para el antígeno gp160 y/o gp41. La expresión "antígeno gp160", como se usa en este documento, se refiere preferiblemente a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en gp160 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprende un epitopo inmunodominante de gp160. La expresión "antígeno gp41", como se usa en este documento, se refiere preferiblemente a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en gp41 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprende un epitopo inmunodominante de gp41.

25 Cuando varios antígenos de la envoltura del VIH-1 se inmovilizan sobre el soporte sólido y se han de considerar, se calcula el valor medio de los valores normalizados, es decir, la suma de valores normalizados de n antígenos de VIH-1 dividido por n.

30 Los inventores observaron que, el valor normalizado o medio de la intensidad(es) de la señal obtenida para el antígeno(s) de la envoltura del VIH-1 se puede utilizar para diferenciar las reactividades cruzadas del VIH-1/VIH-2 de las reactividades verdaderas de VIH-2. Encontraron que, en los casos de la reactividad cruzada de VIH-2, este valor es significativamente menor que el observado en las muestras positivas de VIH-1 y VIH-1/VIH-2. En consecuencia, un valor normalizado o medio para una muestra menor que un valor umbral predeterminado es indicativo de la infección con el VIH-2 solo. Por el contrario, un valor normalizado o medio para una muestra mayor que un valor umbral predeterminado es indicativo de la infección con el VIH-1/VIH-2, o que, para dicha muestra, se necesita una prueba adicional para diferenciar la reactividad cruzada de VIH-1/VIH-2 de la reactividad verdadera de VIH-2.

35 El valor umbral para la segregación de las muestras positivas de VIH-2 de otras muestras se determina dependiendo de la elección y del número de antígenos de envoltura del VIH-1. Preferiblemente, este valor umbral se elige con el fin de satisfacer dos requisitos (i) una frecuencia de muestras positivas de VIH-2 con un valor normalizado o medio por encima del valor umbral lo más bajo posible, y (ii) una frecuencia de muestras positivas de VIH-1 y VIH-1/VIH-2 con un valor normalizado o medio por debajo del valor umbral lo más bajo posible. En particular, este valor umbral puede ser determinado como el punto de cruce más bajo de las curvas que representan las frecuencias acumuladas de (i) las muestras positivas de VIH-1 y/o VIH-1/VIH-2 y (ii) las muestras positivas de VIH-2 frente a los valores normalizados o medios.

40 En una realización, el inmunoensayo es un ensayo del tipo migración, preferiblemente un inmunoensayo de doble camino como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2006/099191, y

45 (1) el valor normalizado se calcula para un antígeno gp160 y el valor umbral predeterminado es de aproximadamente 0,3, preferiblemente entre 0,24 y 0,36, más preferiblemente entre 0,27 y 0,33 e incluso más preferiblemente entre 0,28 y 0,32 o entre 0,29 y 0,31;

50 (2) el valor normalizado se calcula para un antígeno gp41 y el valor umbral predeterminado es de aproximadamente 0,9, preferiblemente entre 0,72 y 1,08, más preferiblemente entre 0,81 y 0,99 e incluso más preferiblemente entre 0,85 y 0,95 o entre 0,87 y 0,93; o

(3) el valor medio se calcula para los antígenos gp160 y gp41 y el valor umbral predeterminado es de aproximadamente 0,6, preferiblemente entre 0,48 y 0,72, más preferiblemente entre 0,54 y 0,66 e incluso más preferiblemente entre 0,57 y 0,63 o entre 0,58 y 0,62.

En una realización particular, el método de la invención comprende:

- 5 (a) poner en contacto una muestra de fluido de un sujeto con al menos un antígeno gp160, preferiblemente gp160 recombinante, y un reactivo de control que es la proteína A, en el que dicho antígeno y dicho reactivo de control se inmovilizan en sitios distintos sobre un soporte sólido, por un tiempo y en unas condiciones que permitan la formación de complejos entre los anticuerpos presentes en la muestra y (i) dicho antígeno de VIH-1 y (ii) dicho reactivo de control;
- (b) detectar la formación de dichos complejos utilizando un sistema de generación de señal cuantificable, en el que dicho sistema es la proteína A conjugada con oro coloidal;
- (c) normalizar la intensidad de la señal obtenida para el antígeno gp160 dividiendo por la intensidad de la señal obtenida para la proteína A obteniendo de este modo el valor normalizado para el antígeno gp160;
- 10 en el que un valor normalizado para el antígeno gp160 menor que un umbral predeterminado de aproximadamente 0,3 es indicativo de que el sujeto está infectado con el VIH-2 solo. Preferentemente, el umbral predeterminado está entre 0,24 y 0,36, más preferiblemente entre 0,27 y 0,33 e incluso más preferiblemente entre 0,28 y 0,32 o entre 0,29 y 0,31.
- En otra realización particular, el método de la invención comprende:
- 15 (a) poner en contacto una muestra de fluido de un sujeto con al menos un antígeno gp41, preferiblemente un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp41, y un reactivo de control que es la proteína A, en el que dicho antígeno y dicho reactivo de control se inmovilizan en sitios distintos en un soporte sólido, durante un tiempo y en condiciones que permitan la formación de complejos entre los anticuerpos presentes en la muestra y (i) dicho antígeno de VIH-1 y (ii) dicho reactivo de control;
- 20 (b) detectar la formación de dichos complejos utilizando un sistema de generación de señal cuantificable, en el que dicho sistema es la proteína A conjugada con oro coloidal;
- (c) normalizar la intensidad de la señal obtenida para el antígeno gp41 dividiendo por la intensidad de la señal obtenida para la proteína A obteniendo de este modo el valor normalizado para el antígeno de gp41;
- 25 en el que un valor normalizado para el antígeno gp41 inferior a un umbral predeterminado de alrededor de 0,9 es indicativo de que el sujeto está infectado con el VIH-2 solo. Preferiblemente, el umbral predeterminado está entre 0,72 y 1,08, más preferiblemente entre 0,81 y 0,99 e incluso más preferiblemente entre 0,85 y 0,95 o entre 0,87 y 0,93.
- En una realización adicional particular, el método de la invención comprende:
- 30 (a) poner en contacto una muestra de fluido de un sujeto con al menos un antígeno gp160, preferiblemente gp160 recombinante, al menos un antígeno gp41, preferiblemente un péptido que comprenda un epítipo inmunodominante de gp41, y un reactivo de control que es la proteína A, en el que dichos antígenos y dicho reactivo de control se inmovilizan en sitios distintos sobre un soporte sólido, durante un tiempo y en condiciones que permitan la formación de complejos entre los anticuerpos presentes en la muestra y (i) dichos antígenos de VIH-1 y (ii) dicho reactivo de control;
- 35 (b) detectar la formación de dichos complejos utilizando un sistema de generación de señal cuantificable, en el que dicho sistema es la proteína A conjugada con oro coloidal;
- (c) normalizar la intensidad de la señal obtenida para el antígeno gp160 y la intensidad de la señal obtenida para el antígeno gp41 dividiendo por la intensidad de la señal obtenida para la proteína A obteniendo de este modo valores normalizados del antígeno gp160 y antígeno gp41;
- 40 (d) calcular el valor medio de valores normalizados de gp160 y antígenos gp41;
- en el que un valor medio para los antígenos gp160 y gp41 inferior a un umbral predeterminado de aproximadamente 0,6 es indicativo de que el sujeto está infectado con el VIH-2 solo. Preferiblemente, el umbral predeterminado está entre 0,48 y 0,72, más preferiblemente entre 0,54 y 0,66 e incluso más preferiblemente entre 0,57 y 0,63 o entre 0,58 y 0,62.
- 45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar la infección por VIH-2 en un sujeto que se sospecha que desarrolle anticuerpos reactivos de forma cruzada a VIH-1/VIH-2, que comprende:
- (a) poner en contacto una muestra de fluido de dicho sujeto con al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1 y un reactivo de control que pueda unir inmunoglobulinas humanas, en el que dicho antígeno y dicho reactivo de control se inmovilizan en sitios distintos sobre un soporte sólido, durante un tiempo y en condiciones que permitan la formación de complejos entre los anticuerpos presentes en la muestra y (i) dicho antígeno de VIH-1 y (ii) dicho reactivo de control;
- 50 (b) detectar la formación de dichos complejos utilizando un sistema de generación de señal cuantificable;

(c) normalizar la intensidad de la señal obtenida para dicho al menos un antígeno de envoltura de VIH-1 mediante la división por la intensidad de la señal obtenida para el reactivo de control obteniendo de este modo el valor normalizado para dicho al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1;

5 (d) si se utilizan varios antígenos de la envoltura de VIH-1, calcular opcionalmente el valor medio de los valores normalizados para los antígenos de la envoltura del VIH-1;

en el que un valor normalizado o medio para el antígeno(s) de la envoltura del VIH-1 inferior a un umbral predeterminado es indicativo de que el sujeto está infectado con el VIH-2 solo.

Todas las realizaciones del método de la invención de acuerdo con el primer aspecto se contemplan también en este aspecto.

10 Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describirán en los siguientes ejemplos, que deben considerarse como ilustrativos y no limitativos.

### Ejemplos

#### Materiales y métodos

#### Muestras seropositivas

15 Los sujetos seropositivos se obtuvieron a partir de paneles comerciales (Promedex o Bocabiostics) o de los hospitales (La Pitié Salpetriere, Bichat, París, Francia). La clasificación (VIH-1, VIH 2 o VIH-1/VIH-2 positivo) de cada muestra se confirmó usando ensayos de Western-blot (New Lav Blot 1, New Lav Blot 2, Bio-Rad Laboratories). Alternativamente, se pueden usar cualesquiera otros ensayos de Western-blot adecuados (incluyendo los VIH-1 de Genetic Systems) y/o ensayos de amplificación de PCR adecuados.

20 Se evaluaron dos lotes de inmunoensayo "Geenius": lote A y lote B. Un primer grupo de muestras comprende 293 muestras seropositivas (135 VIH-1, 154 VIH-2 y 4 VIH-1/VIH-2 dualmente reactiva). Un segundo grupo de muestras de un total de 182 muestras seropositivas (50 VIH-1 y 132 VIH-2).

#### El dispositivo de inmunoensayo "Geenius"

25 Los experimentos se llevaron a cabo utilizando un dispositivo de inmunoensayo de doble camino como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2006/099191. Este dispositivo se denomina a continuación dispositivo "Geenius".

30 En pocas palabras, este dispositivo comprende una primera tira para la recogida y el transporte de la muestra a ensayar (figura 1A, tira 1) y una segunda tira para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 y VIH-2 (figura 1A, tira 2). La primera y segunda tiras se laminan en una tarjeta de plástico y se tocan entre sí en la ubicación del sitio de prueba.

35 La primera tira comprende una almohadilla de muestra de papel de celulosa unida a una membrana de nitrocelulosa. La segunda tira comprende una almohadilla de tampón, una almohadilla de conjugado de oro, líneas de prueba y de control y una almohadilla sumergible. La almohadilla de conjugado de oro se obtuvo mediante la pulverización de proteína A conjugada con partículas de oro coloidal de color púrpura. Las líneas de prueba se obtuvieron mediante la inmovilización de péptidos de VIH-1 y VIH-2 o proteínas recombinantes. En particular, el dispositivo utilizado en este ejemplo consta de: línea 1: péptido sintético de VIH-2 gp36 (envoltura de VIH-2); línea 2: péptido sintético del VIH-2 gp140 (envoltura de VIH-2); línea 3: péptido sintético del VIH-1 p31 (polimerasa de VIH-1); línea 4: proteína recombinante de VIH-1 gp160 (envoltura del VIH-1); línea 5: proteína recombinante de VIH-1 p24 (núcleo del VIH-1); y la línea 6: péptido sintético del VIH-1 gp41 (VIH-1 Grupo de envoltura M & O) (fig. 1B). La línea de control consiste en la proteína A inmovilizada

#### Procedimiento de ensayo con el dispositivo Geenius

45 Para cada muestra, se añadieron 5 µl de suero o plasma o 15 µl de sangre entera en la almohadilla de la muestra de un dispositivo de Geenius con 60 µl de tampón. Después de esperar entre uno y cinco minutos (preferiblemente uno o dos minutos) hasta que la muestra alcanzó la zona de prueba (es decir, las líneas de prueba y de control), se añadieron en la almohadilla de tampón 150 µl del mismo tampón movilizándolo así el conjugado de oro en las líneas de prueba y control. Después de unos quince minutos, se leyeron los resultados de la prueba.

La interpretación básica de los resultados se basa en la presencia o la ausencia del color púrpura en las líneas de prueba y de control.

50 Si sólo la línea de control mostraba el color púrpura, la prueba se interpretaba como resultado negativo del VIH. Si al menos 2 líneas de VIH-1 (una de las cuales siendo la línea de envoltura) y la línea de control mostraban color púrpura, la prueba se interpretaba como positivo para los anticuerpos del VIH-1. Si las 2 líneas de VIH-2 y la línea de control mostraban el color púrpura, la prueba se interpretaba como positiva para los anticuerpos del VIH-2. Si al

menos una línea de VIH-1, al menos una línea de VIH-2 y la línea de control mostraban color púrpura, la prueba se interpretaba como resultado reactivo de VIH indiferenciado. Estos resultados se obtuvieron usando un lector automatizado que capturaba y analizaba imágenes.

Procedimientos de prueba con Multispot® VIH-1/VIH-2 Rapid Test e Puntuación de INNO-LIA™ VIH I/II

- 5 Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Los ensayos Multispot se llevaron a cabo en muestras puras y muestras 1:100 diluidas.

Resultados

Clasificación de las muestras de VIH basado en la reactividad con las líneas de prueba de VIH-1 y/o VIH-2 del dispositivo Geenius

- 10 La reactividad de todas las muestras de VIH probadas en el presente documento se confirmaron por Western-blot o amplificación por PCR. Todas estas muestras se ensayaron usando el dispositivo "Geenius" como se describió anteriormente. Usando lectura visual o automatizada, la apariencia del color de púrpura sobre las líneas de prueba del VIH-1 y/o VIH-2 se determinó y las muestras fueron clasificadas de este modo como VIH-1 reactiva, VIH-2 reactiva o VIH reactiva indiferenciada.
- 15 En este estudio, ninguna de las muestras VIH-1 reactivas mostró reactividad cruzada en las líneas VIH-2 mientras que entre 66,9 y 68,2% de muestras VIH-2 reactivas fueron clasificadas como no diferenciadas (Tabla 1).

Uso de intensidades de color de bandas gp160 y gp41 para mejorar la diferenciación de VIH-1/2

- 20 El color de cada banda es el resultado de la agregación de proteína A conjugada con partículas de oro coloidal de color púrpura. Esta agregación es debida a la unión de la proteína A a la porción Fc de las inmunoglobulinas que reaccionan con el antígeno inmovilizado. La intensidad del color de cada banda depende por lo tanto de la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra que es capaz de unirse al antígeno inmovilizado.

- 25 La intensidad del color se midió para las bandas gp160, gp41 y de control para cada muestra VIH-1 positiva o VIH-2 positiva no diferenciada de los lotes A y B utilizando un lector automatizado. Los valores en bruto obtenidos de las bandas gp160 y gp41 se normalizaron mediante el cálculo de la relación de los valores de intensidad de las bandas de gp160 y gp41 para el valor de intensidad de la banda de control ( $(gp160 + gp41/control)$ ). Los valores medios de los dos antígenos de la envoltura del VIH-1 se calcularon entonces  $((gp160 + gp41/control)/2)$ .

Se encontró que los valores medios de muestras VIH-2 indiferenciadas eran significativamente más bajos que los valores medios de las muestras positivas de VIH-1, lo que demuestra que esta relación podría ser utilizada para diferenciar las reactividades cruzadas de las reactividades verdaderas (Figuras 2 a 4).

- 30 A un valor umbral para los valores medios  $((gp160 + gp41/control)/2)$  de 0,6, sólo el 6,5 y 4,5% de muestras VIH-2 positivas de los lotes A y B, respectivamente, se mantuvieron indiferenciadas (Figura 4). Teniendo en cuenta este valor umbral, una muestra que tiene un valor medio inferior a 0,6 se interpretó como positiva para los anticuerpos del VIH-2.

Uso de la intensidad de color de la banda de gp160 para mejorar la diferenciación de VIH-1/2

- 35 La intensidad del color se midió para las bandas de gp160 y control para cada muestra de VIH-1 positiva o VIH-2 positiva no diferenciada de los lotes A y B utilizando un lector automatizado. Los valores en bruto obtenidos a partir de las bandas de gp160 se normalizaron mediante el cálculo de la relación entre el valor de la intensidad de la banda de gp160 frente al valor de la intensidad de la banda de control ( $gp160/control$ ).

- 40 Los valores normalizados de la intensidad de la banda gp160 de muestras VIH-2 indiferenciadas se encontró que eran significativamente más bajos que los valores normalizados de las muestras positivas de VIH-1, lo que demuestra que esta relación podía ser utilizada para diferenciar las reactividades cruzadas de las reactividades verdaderas (Figura 5).

- 45 A un valor umbral para los valores normalizados ( $gp160/control$ ) de 0,3, sólo el 5,8 y el 7,6% de las muestras VIH-2 positivas de los lotes A y B, respectivamente, se mantuvieron indiferenciadas (Figuras 6 y 7). Teniendo en cuenta este valor umbral, una muestra que tiene un valor normalizado inferior a 0,3 se interpretó como positivo para los anticuerpos del VIH-2.

Co-infección de VIH-1/VIH-2

Debido a la baja proporción de co-infección de VIH-1/VIH-2, los grupos comprendían solamente 4 muestras de VIH-1/VIH-2 dualmente reactivas.

Los valores normalizados de la intensidad de la banda de gp160 (gp160/control) se calcularon para cada muestra usando el método que se describe anteriormente. Los inventores encontraron que, para este valor, la distribución de muestras co-infectadas de VIH-1/VIH-2 fue similar a la de muestras VIH-1 positivas (Figura 8). Este valor, por lo tanto, se puede utilizar para diferenciar las muestras VIH-2 positivas de reacción cruzada de las muestras reactivas VIH-1/VIH-2 verdaderas.

5

Comparación con Multispot VIH-1/VIH-2 Rapid Test

Todas las muestras se ensayaron también usando el Multispot VIH-1/VIH-2 Rapid Test de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los resultados se presentan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Porcentaje de muestras positivas de VIH-2 no diferenciadas en los lotes A y B

| Nº de lote | Nº de muestras VIH-2 positivas | Porcentaje de muestras VIH-2 positivas indiferenciadas |                        |                              |                             |                                   |
|------------|--------------------------------|--|------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
|            |                                | Muestra neta de Multispot                              | Geenius sin proporción | Muestra diluida de Multispot | Geenius con valor medio (a) | Geenius con valor normalizado (b) |
| A          | 154                            | 73,4   | 66,9                   | 7,1                          | 6,5                         | 5,8                               |
| B          | 132                            | 78,2 (c)   | 68,2                   | 1,5                          | 4,6                         | 7,6                               |

10

(a) Geenius con valor medio ((gp160 + 41)/control)/2) (umbral de 0,6)

(b) Geenius con valor normalizado (gp160/control) (umbral de 0,3)

(c) Calculado con 55 muestras de un total de 132 muestras de VIH-2 positivos

15

Esta tabla presenta el porcentaje de muestras VIH-2 positivas no diferenciadas en los lotes A y B obtenidos con la prueba de Multispot con y sin dilución, la prueba Geenius sin utilizar cualquier proporción para la interpretación (sólo basada en la apariencia de color en líneas de prueba), y la prueba de Geenius utilizando los valores normalizados para la banda gp160 (con un umbral de 0,3) o los valores medios de bandas de gp160 y gp41 (con un umbral de 0,6) para diferenciar las muestras de reacción cruzada de las muestras reactivas verdaderas.

20

Estos resultados demuestran que la interpretación de la prueba Geenius con la proporción (gp16/control) o ((gp160 + gp41)/control)/2) permite alcanzar un menor de muestras VIH reactivas indiferenciadas que la prueba Multispot con el beneficio de ninguna necesidad de la dilución de muestras y, por lo tanto, simplificar el procedimiento.

Comparación con la puntuación de INNO-LIA™ VIH I/II

25

18 de estas muestras VIH-2 positivas fueron analizadas usando la prueba de puntuación INNO-LIA™ VIH I/II, la prueba Geenius sin necesidad de utilizar cualquier proporción para la interpretación (sólo basada en la apariencia del color de las líneas de prueba), y la prueba Geenius usando los valores medios para las bandas gp160 y gp41 (con un umbral de 0,6) o los valores normalizados de la banda gp160 (con un umbral de 0,3) para diferenciar las muestras VIH-1/VIH-2 reactivas de forma cruzada frente a las muestras VIH-2 reactivas verdaderas.

Todas las muestras fueron analizadas con la prueba de puntuación INNO-LIA™ VIH I/II de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

30

Tabla 2: Muestras VIH-2 positivas analizadas utilizando la prueba de puntuación INNO-LIA™ VIH I/II y la prueba Geenius con o sin el uso de la proporción para la interpretación.

|          | prueba de puntuación INNO-LIA™ VIH I/II | Geenius sin proporción          | Geenius con valor medio (a) | Geenius con valor normalizado (b) |
|----------|---|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Boca 250 | seropositivos                           | probable VIH-2                  | probable VIH-2              | probable VIH-2                    |
| Boca 251 | probable VIH-2                          | probable VIH-2                  | probable VIH-2              | probable VIH-2                    |
| Boca 252 | probable VIH-2                          | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2              | probable VIH-2                    |
| Boca 253 | seropositivos                           | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2              | probable VIH-2                    |

ES 2 596 303 T3

|          |                |                                 |                |                |
|----------|----------------|---------------------------------|----------------|----------------|
| Boca 254 | Probable VIH-2 | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 255 | probable VIH-2 | probable VIH-2                  | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 256 | probable VIH-2 | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 257 | probable VIH-2 | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 258 | seropositivo   | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 259 | probable VIH-2 | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 261 | probable VIH-2 | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 263 | probable VIH-2 | probable VIH-2                  | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 264 | seropositivo   | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 265 | seropositivo   | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 266 | probable VIH-2 | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 267 | probable VIH-2 | VIH-1/VIH-2 reactividad cruzada | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 268 | probable VIH-2 | probable VIH-2                  | probable VIH-2 | probable VIH-2 |
| Boca 269 | probable VIH-2 | probable VIH-2                  | probable VIH-2 | probable VIH-2 |

(A) Geenius con valor medio  $((gp160 + 41)/control)/2$  (umbral de 0,6)

(B) Geenius con valor normalizado  $(gp160/control)$  (umbral de 0,3)

Con la prueba de puntuación INNO-LIA™ VIH I/II 27,8% de este grupo se mantuvo indiferenciado.

5 Utilizando el método de la invención con el dispositivo Geenius, los valores normalizados para la intensidad de la banda gp160  $(gp160/control)$  y un umbral de 0,3 o los valores medios para las intensidades de banda de gp160 y gp41  $(((gp160 + gp41)/control)/2)$  y un umbral de 0,6, todas las muestras se clasificaron correctamente como resultados VIH-2 positivos.

Referencias

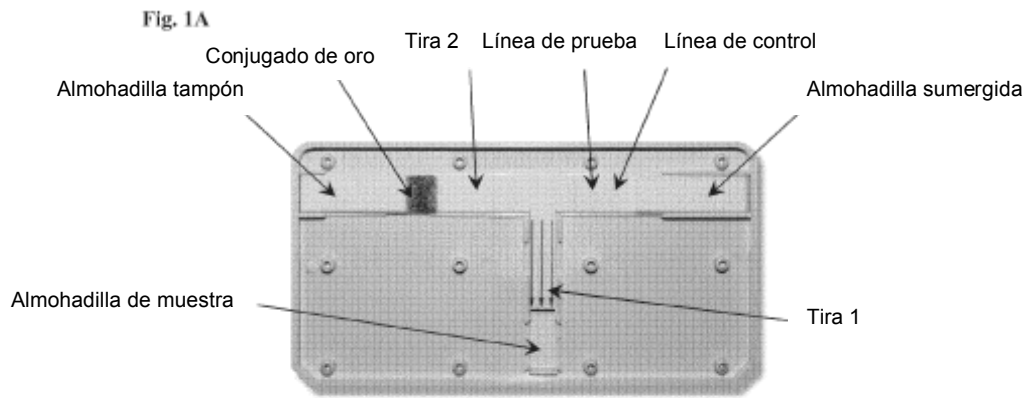
- Arora y Seth, *Gene Ther Mol Biol* Vol 7, 37-42, 2003
- Barin et al., *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1 de Septiembre de 1996; 12 (13): 1279-1289.
- 5 Benjouad et al., *J Virol*. 1993 Mar; 67 (3): 1693-7.
- Delaney et al., *J Clin Virol*. 2011 Dec; 52 Suppl 1: S5-10
- Espejo y Uribe, *J Clin Microbiol*. 1990 Sep; 28 (9): 2107-10
- Guyader et al. *Nature* 326: 662-669, 1987
- Penn-Nicholson et al., *Virology*. 2008 15 de MAR; 372 (2): 442-56.
- 10 Ng et al., *Anal Bioanal Chem*. 2010 Jun; 397 (3): 991 a 1.007.
- Ntemgwa et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53 (9): 3611-9.
- Pandori y Branson, *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8 (6): 631-3
- Robinson et al., *J Virol*. 1990 Nov; 64 (11): 5301-5.
- Song et al., *Biomed Microdevices*. 2012 29 de Feb
- 15 Styer et al. *J Clin Virol*. 2011 Dec; 52 Suppl I: S35-40
- Tomaras et al., *J Virol*. 2008 Dec; 82 (24): 12449-63
- Xu et al., *J Virol*. 1991 Sep; 65 (9): 4832-8.

**REIVINDICACIONES**

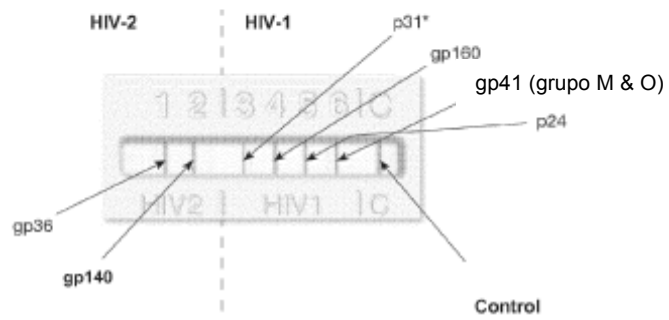
1. Un método in vitro para la diferenciación de la infección con el VIH-2 de la infección con ambos VIH-1 y VIH-2 en un sujeto sospechoso de ser ya sea VIH-2 positivo o VIH-1/VIH-2 positivo, que comprende:
  - 5 (a) poner en contacto una muestra de fluido del sujeto con al menos un antígeno de envoltura de VIH-1 y un reactivo de control que puede unirse a inmunoglobulinas humanas, en el que dicho antígeno y dicho reactivo de control se inmovilizan en sitios distintos sobre un soporte sólido, por un tiempo y en condiciones que permitan la formación de complejos entre los anticuerpos presentes en la muestra y (i) dicho antígeno de VIH-1 y (ii) dicho reactivo de control;
  - (b) detectar la formación de dichos complejos utilizando un sistema de generación de señal cuantificable;
  - 10 (c) normalizar la intensidad de la señal obtenida para dicho al menos uno antígeno de la envoltura del VIH-1 dividiendo por la intensidad de la señal obtenida para el reactivo de control obteniendo de este modo el valor normalizado para dicho al menos uno antígeno de la envoltura del VIH-1;
  - (d) si se utilizan varios antígenos de la envoltura del VIH-1, calcular opcionalmente el valor medio de los valores normalizados para antígenos de la envoltura de VIH-1;
  - 15 en el que un valor normalizado o medio para el antígeno(s) de la envoltura del VIH-1 inferior a un umbral predeterminado es indicativo de que el sujeto está infectado con el VIH-2 solo.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1 se selecciona del grupo que consiste en gp160 recombinante, gp41 y gp120, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp160, gp41 o gp120.
- 20 3. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho al menos un antígeno de la envoltura del VIH-1 se selecciona del grupo que consiste en gp160 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, o un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp160.
4. El método según la reivindicación 3, en el que en la etapa (a) la muestra de fluido se pone en contacto adicionalmente con un antígeno de la envoltura del VIH-1 seleccionado del grupo que consiste en gp41 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, o un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp41, preferiblemente un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp41.
- 25 5. El método según la reivindicación 3, en el que el umbral predeterminado para el valor normalizado para el antígeno gp160 es de aproximadamente 0,3, preferiblemente entre 0,27 y 0,33.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el umbral predeterminado para el valor medio para los antígenos gp160 y gp41 es de aproximadamente 0,6, preferiblemente entre 0,54 y 0,66.
- 30 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que en la etapa (a) la muestra de fluido se pone en contacto adicionalmente con al menos un antígeno del VIH-2, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en gp36 recombinante, gp105 y gp140, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de gp36, gp105 o gp140.
- 35 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que en la etapa (a) la muestra de fluido se pone en contacto adicionalmente con al menos un antígeno del núcleo de VIH-1 y/o al menos un antígeno pol del VIH-1, preferiblemente se pone en contacto además con al menos un antígeno VIH-1 seleccionado de entre el grupo que consiste en p31 y p24 recombinante, un fragmento antigénico del mismo, y un péptido que comprende un epítipo inmunodominante de p31 o p24.
- 40 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra de fluido se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero y plasma.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el inmunoensayo es un ensayo de tipo migración, una prueba de flujo continuo, un ensayo de tira reactiva o un ensayo microfluídico, preferiblemente un ensayo de tipo migración.
- 45 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el reactivo de control se selecciona entre el grupo que consiste en proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L y derivados de las mismas, y un anticuerpo de inmunoglobulina anti-humana, preferiblemente la proteína A.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que, en la etapa (b), el sistema de generación de señal cuantificable es un reactivo capaz de unirse a inmunoglobulinas humanas conjugadas con un marcador detectable.
- 50



13. El método según la reivindicación 12, en el que el reactivo capaz de unirse a las inmunoglobulinas humanas se selecciona del grupo que consiste en proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L y derivados de las mismas, y un anticuerpo de inmunoglobulina anti-humana, preferiblemente la proteína A.
- 5 14. El método según la reivindicación 12 ó 13, en el que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en metales coloidales; coloides no metálicos; carbón; colorantes visibles, fluorescentes, luminiscentes y quimioluminiscentes; partículas magnéticas; elementos radiactivos; y enzimas.
- 10 15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el sistema de generación de señal cuantificable es un conjugado que comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L y derivados de las mismas, junto con una de metal coloidal o un colorante fluorescente, luminiscente o quimioluminiscente, preferiblemente la proteína A conjugada con oro coloidal.



**Fig. 1B**



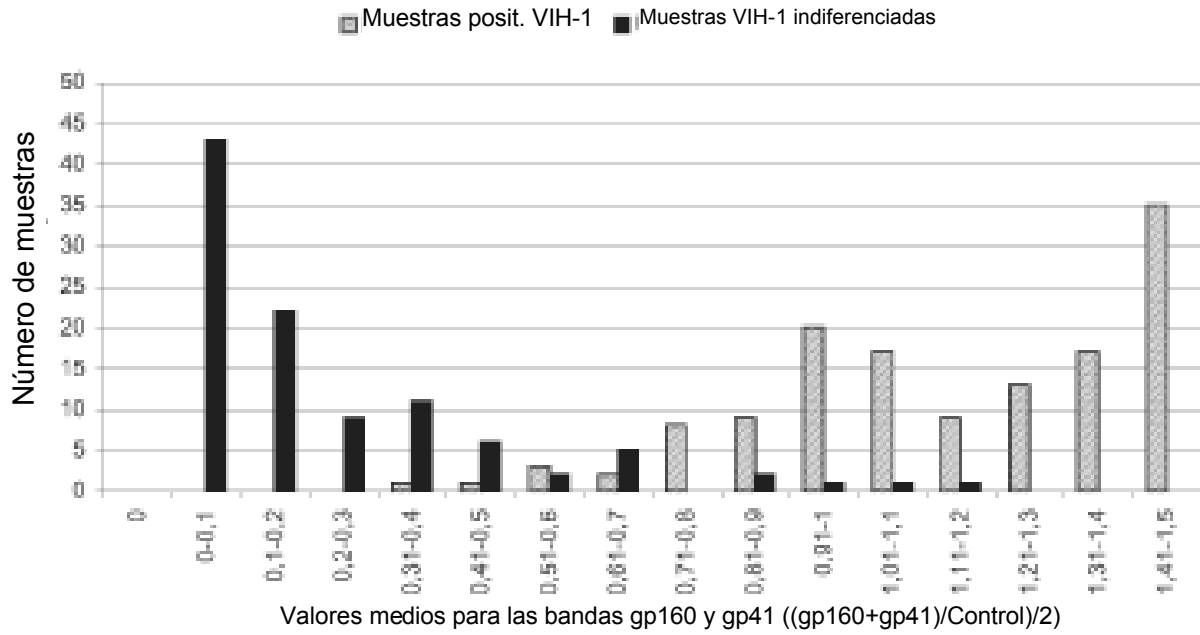


Figura 2

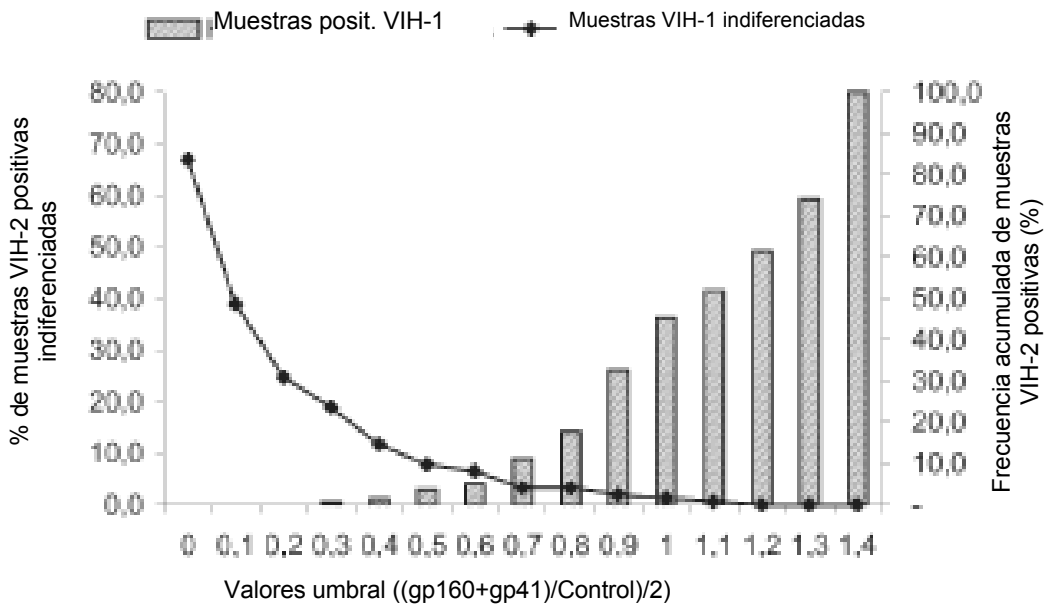


Figura 3

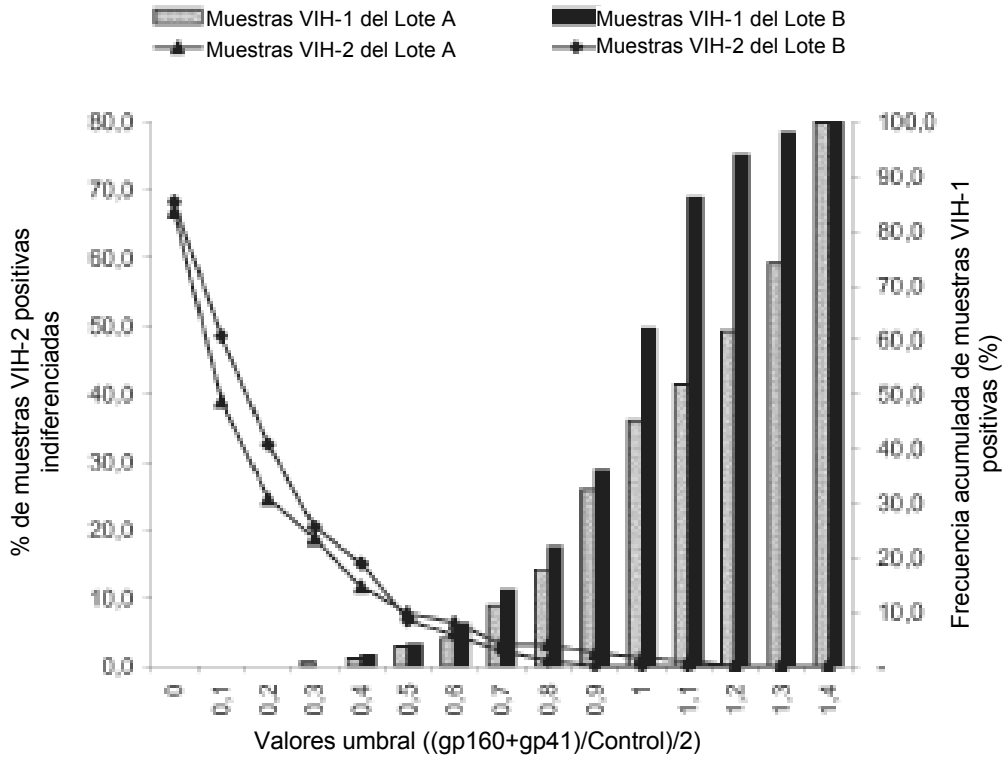


Figura 4

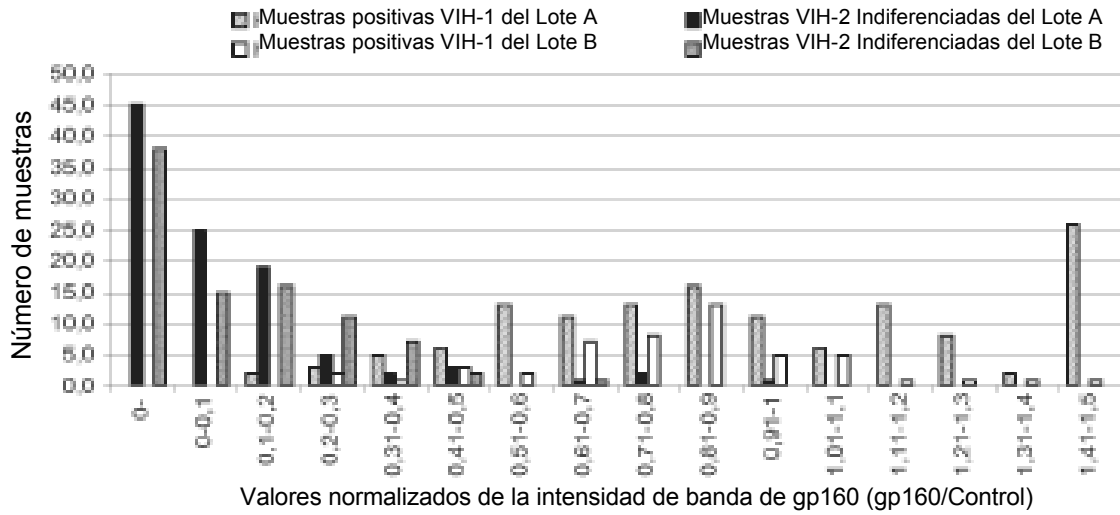


Figura 5

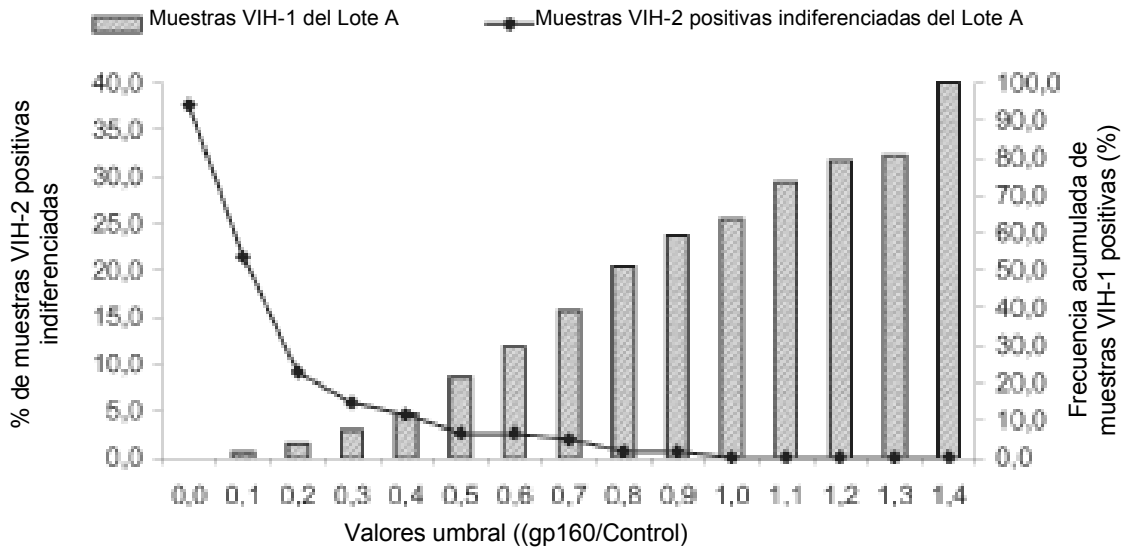


Figura 6

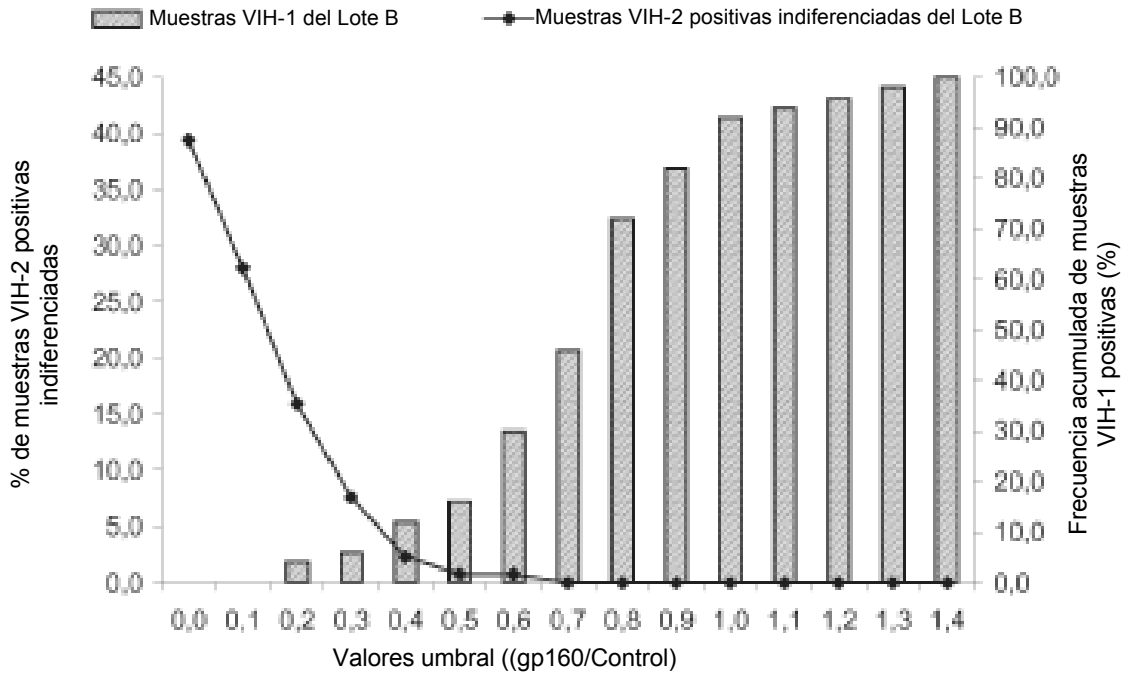


Figura 7

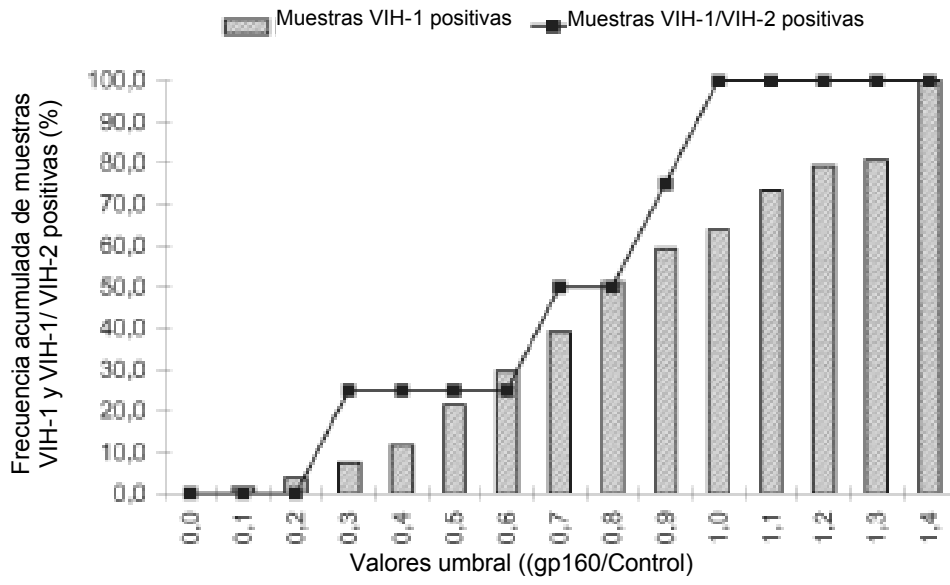


Figura 8