

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 370**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/10** (2006.01)  
**C12N 5/20** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C07K 14/16** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)  
**C07K 14/005** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2001** **E 10179020 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017** **EP 2336175**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**06.12.2000 US 731126**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.06.2017**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)**  
**100 Abbott Park Road**  
**Abbott Park, IL 60064-3500, US**

72 Inventor/es:

**LOU, SHENG, C.;**  
**HUNT, JEFFREY, C.;**  
**KONRATH, JOHN, G.;**  
**QIU, XIAOXING;**  
**SCHEFFEL, JAMES, W. y**  
**TYNER, JOAN, D.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 619 370 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

Anticuerpos monoclonales contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana y usos de los mismos

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la técnica**

10 La presente divulgación se refiere a nuevos anticuerpos monoclonales que se pueden utilizar en la detección del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Estos anticuerpos presentan un alto grado poco común de sensibilidad, un intervalo de especificidad impresionantemente amplio y se unen a nuevos epítomos compartidos, no de reacción cruzada. En particular, los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden utilizar para detectar el antígeno de VIH-1 y el antígeno nuclear de VIH-2 en una muestra de un paciente.

15 **Información antecedente**

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es una enfermedad infecciosa e incurable que se transmite a través del contacto sexual entre individuos infectados con VIH o por exposición a sangre o productos sanguíneos contaminados con VIH. El VIH-1 incluye los virus llamados anteriormente Virus linfotróficos humanos de células T Tipo III (HTLV III), Virus Asociados a Linfadenopatías (LAV), y retrovirus asociados con el SIDA (ARV). El VIH es un retrovirus que se relaciona con un grupo de retrovirus citopáticos, a saber, los lentivirus, basándose en sus características morfológicas, la organización genómica, y la secuencia de nucleótidos (Gonda et al., Science (1985) 277:177-179; Stephan et al., Science (1986) 231:589-594; Korber, B. (ed.) et al., Human Retroviruses and AIDS. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Publicado por Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, Nuevo Méjico; Revisado en, Schochetman, G. y George, J.R., (1994) AIDS Testing. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg). El VIH es un virus encapsulado que contiene varias proteínas estructurales. Es de relevancia particular que el núcleo del virus está formado por la condensación de productos de escisión a partir de un precursor de la poliproteína gag-pol altamente procesado (Pr180gag-pol) que se escinde en un precursor pol y un precursor gag (Pr55gag). Posteriormente, el precursor nuclear Pr55gag se escinde en p17 (proteína gag miristilada), p24 (proteína estructural principal), p7 (proteína de unión al ácido nucleico), y p9 (proteína rica en prolina). La envoltura contiene dos proteínas estructurales, gp120 (glucoproteína de la envoltura) y gp41 (proteína transmembrana) que son productos de escisión del precursor polipeptídico de la envoltura, el gp160.

35 La mayoría de los marcadores comunes de la infección por VIH son anticuerpos contra las proteínas víricas estructurales (Dawson, et al., J. Infect. Dis. (1988) 157:149-155; Montagnier, et al. Virology (1985) 144:283-289; Barin, et al., Science (1985) 228:1094-1096; Schulz, T.F., et al., Lancet (1986) 2:111-112; Samgadharan, et al., Science (1984) 224:506-508; Allan, et al., Science (1985) 228:1091-1093) and viremia in the form of detectable viral core antigen (antigenemia) (Kessler, et al., JAMA (1987) 258:1196-1199; Phair, JAMA (1987) 258:p1218; Allain, et al., The Lancet (1986) ii:1233-1236; Kenny, et al., The Lancet (1987) 1 (8532) :565-566; Wall, et al., The Lancet (1987) 1(8532) :p566; Stute, The Lancet (1987) 1(8532) :p566; Goudsmit, et al., The Lancet (1986) ii: 177-180; von Sydow, et al., Brit. Med. J. (1988) 296:238-240; Bowen, et al. Ann. of Int. Med. (1988) 108:46-48) o detectable viral nucleic acid (Mellors, et al., Science (1996) 272: 1167-1170; Saag, et al. Nat. Med. (1996) 2: 625-629; Mulder, et al. J. Clin. Microbiol. (1994) 32:292-300; Zhang, et al., AIDS (1991) 5(6):675-681; Simmonds, et al., J. Virology (1990) 64(2):864-872). Por ejemplo, en los Estados Unidos, se exige la exploración de la sangre y productos sanguíneos mediante ensayos para detectar anticuerpos o antígenos (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, 21 U.S.C. §§ 301 et seq., Public Health Service Act 42 U.S.C. §§ 201 et seq.). Recientemente se ha implementado el ensayo de ácidos nucleicos con el fin de conseguir la máxima reducción de la ventana de seroconversión del VIH (www.fda.gov). Como un ejemplo adicional, varios países de Europa han empezado a evaluar y utilizar ensayos que detectan anticuerpos y antígenos simultáneamente (Ly, et al. J. Clin. Microbiol. (2000) 38(6): 2459-2461; Gurtler, et al., J. Virol. Methods (1998) 75: 27-38; Weber, et al., J. Clin. Microbiol (1998) 36(8): 2235-2239; Courouche', et al., La Gazette de la Transfusion (1999) N°155-Marzo-Abril; Van Binsbergen, et al., J. Virol. Methods (1999) 82: 77-84), además de la implementación Europea de ensayos de ácido nucleico. Los ensayos serológicos que combinan la detección de anticuerpos y antígenos presentan una sensibilidad a la seroconversión superior en comparación con los ensayos que detectan solamente anticuerpos, debido a que la detección del antígeno, que aparece antes que el anticuerpo, reduce la ventana de seroconversión. Una versión reciente de un ensayo combinado de VIH se describe en Gallarda, et al., 1992, documento WO93/21346, Assay for Detection of VIH Antigen and Antibody.

60 Varias semanas tras la infección con VIH, los individuos generalmente entran en una fase clínica que se caracteriza por una viremia extensa y síntomas agudos. Durante este periodo, antes de la seroconversión, se puede detectar transitoriamente el antígeno nuclear p24 de VIH en especímenes de suero o plasma (antigenemia) (Devare, et al., (1990) En, Human Immunodeficiency Virus: Innovative Techniques. Monograph in Virology, J.L. Melnick (ed.), Basel, Karger, vol. 18: 105-121; Kessler, et al. JAMA (1987) 258: 1196-1199; Phair, J.P., JAMA (1987) 258: p1218; Allain, et al. The Lancet (1986) ii: 1233-1236; Kenny, et al., The Lancet (1987) 1(8532): 565-566; Wall, et al., The Lancet (1987) 1(8532): 566; Stute, R., The Lancet (1987) 1(8532): 566; Goudsmit, et al., The Lancet (1986) ii: 177-180; von Sydow, et al., Brit. Med. J. (1988) 296: 238-240; Bowen, et al., Ann. of Int. Med. (1988) 108: 46-48). Tras la

seroconversión, la proteína nuclear se une aparentemente a los anticuerpos en complejos inmunitarios circulantes, lo que hace que la detección de la proteína nuclear sea difícil y se necesiten técnicas de destrucción del complejo inmunitario (Schupbach, et al., AIDS (1996) 10:1085-1090; Kageyama, et al., J. Virol. Methods (1988) 22: 125-131; Mathiesen, et al., J. Virol. Methods (1988) 22: 143-148; Steindl, et al., J. Immunol. Methods (1998) 217: 143-151; Euler, et al., Clin. Exp. Immunol. (1985) 59: 267-275; Gupta, et al., New Eng. J. Med. (1984) 310: 1530-1531; Griffith, et al., J. Clin. Microbiol. (1995) 33: 1348-1350). Tras la fase virémica inicial y a lo largo del resto de la enfermedad, el virus establece en general un nivel de estado estable (revisado en Coffin, J.M. Science (1995) 267: 483-489).

Las proteínas nucleares de los aislados de VIH-1 grupo O, VIH-1 grupo M, y VIH-2 son similares antigénicamente debido a que comparten regiones de homología de secuencia de aminoácidos. El suero policlonal inmune humano (o de ratón) (es decir, las inmunoglobulinas) que se produce contra la proteína nuclear de un grupo o tipo reaccionará de manera cruzada contra la proteína nuclear de un grupo o tipo diferente (Clavel, et al., Science (1986) 233: 343-346; Guyader, et al., Nature (1987) 326: 662-669; Barin, et al., Lancet (1985) 2: 1387-1389; Kanki, et al., Science (1986) 232: 238-243; Kanki, et al., Science (1987) 236: 827-831; Clavel, et al., Nature (1986) 324: 691-695; Hunt, et al., AIDS Res. Human Retroviruses (1997) 13: 995-1005; Gurtler, et al., J. Virol. Methods (1995) 51: 177-184; Mauciere, P. AIDS (1997) 11: 445-453). Sin embargo, al contrario que en los sueros policlonales inmunes humanos (o de ratón), los anticuerpos monoclonales humanos o de ratón que se originan o producen contra la proteína nuclear de un grupo o tipo de VIH pueden reaccionar (Mehta, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.173.399; Butman, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.210.181; Butman, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.514.541) o no (Mehta, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.173.399; Butman, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.210.181; Butman, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.514.541) contra la proteína nuclear de un grupo o tipo de VIH diferente. A menudo, sin embargo, no se ha considerado ni enseñado ni la reactividad cruzada ni la reactividad compartida (Tijssen, 1993 En, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. R.H. Burdon y P.H. van Knippenberg, eds. Vol. 15. Elsevier, Amsterdam de los anticuerpos monoclonales de ratón (Kortright, et al., Patente de EE. UU. Nº 4.888.290; Kortright, et al., Patente de EE. UU. Nº 4.886.742). En los casos en los que se detectaron las proteínas nucleares VIH-1 y VIH-2 simultáneamente (Butman, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.210.181; Butman, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.514.541), se necesitaba al menos una combinación de 3 monoclonales, y la sensibilidad cuantitativa resultante contra la proteína nuclear de VIH-1 era mucho mayor (50 veces) que para la proteína nuclear de VIH-2, indicando que los monoclonales identificaban epítomos de reacción cruzada y no los epítomos compartidos. Normalmente, los anticuerpos monoclonales presentan una afinidad más baja contra los antígenos de reacción cruzada (epítomos) (Karush, F. (1978) En, Comprehensive Immunology, ed. R.A. Good, S.B. Day, 5: 85-116. New York/London: Plenum; Mariuzza, et al., Rev. Biophys. Biophys. Chem. (1987) 16: 139-159; Tijssen, (1993) En, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. R.H. Burdon y P.H. van Knippenberg, eds. Vol. 15. Elsevier, Amsterdam) en comparación con la afinidad contra el antígeno inmunizante (epítomo) o el epítomo compartido, dando como resultado una menor sensibilidad contra el antígeno de reacción cruzada.

Los epítomos compartidos no se identifican fácilmente, particularmente en las proteínas con secuencias relacionadas pero diferentes. Un cambio en un único aminoácido en un epítomo puede destruir o modificar la unión de un anticuerpo monoclonal a ese epítomo (Mariuzza, et al., Rev. Biophys. Biophys. Chem. (1987) 16: 139-159). Además, en las proteínas, los cambios de aminoácidos (o las diferencias) en sitios distintos del epítomo pueden cambiar el epítomo debido a cambio en el plegamiento proteico (Mariuzza, et al., Rev. Biophys. Biophys. Chem. (1987) 16: 139-159; Laver, et al., Cell (1990) 61: 553-556), alterando de esta manera la unión de un anticuerpo al epítomo. A este respecto, las proteínas nucleares del Grupo M de VIH-1, Grupo O de VIH-1, y VIH-2 se relacionan pero no son idénticas (Korber, *ibid*), y aunque se sabe que existen epítomos de reacción cruzada entre las proteínas nucleares de VIH, ni se tiene la certeza ni se ha enseñado que estén presentes epítomos compartidos.

La extensa variabilidad genética (y por lo tanto antigénica) del VIH no se había previsto, aunque muchos papeles científicos han buscado cómo aportar explicaciones para los mecanismos de variabilidad (Meyerhans, et al., Cell (1989) 58: 901-910; Wain-Hobson, Curr. Top. Microbiol. Immunol. (1992) 176:181-193; Holland, et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. (1992) 176: 1-20; Gao, F. et al., Nature (1999) 397: 436-441; Sharp, et al., Biol. Bull. (1999) 196: 338-342; Robertson, et al., Nature (1995) 374: 124-126; Zhu, J. Virol. (1995) 69: 1324-1327). La determinación de la variabilidad genética (y por lo tanto antigénica) del VIH solamente se ha basado en muchas observaciones empíricas que posteriormente han dado lugar a la clasificación filogenética basada en la variación de la secuencia de ácido nucleico y aminoácidos del VIH (Korber, *ibid*). De manera similar, no se puede hacer la predicción de epítomos compartidos entre las proteínas (nucleares) del VIH debido a (a) se tienen que descubrir primero las secuencias de proteína (nuclear), (b) una vez descubiertas, la variación genética proporciona una complejidad e incertidumbre para la identificación de epítomos compartidos y (c) son necesarios el descubrimiento y caracterización de epítomos para diferenciar los epítomos de reacción cruzada de los epítomos compartidos. Los epítomos compartidos entre el Grupo M de VIH-1, Grupo O de VIH-1, y VIH-2 no se pudo determinar hasta el descubrimiento del Grupo O de VIH-1 en 1994 (Gurtler, et al., J. Virol. (1994) 68: 1581-1585; Haesevelde, et al., J. Virol. (1994) 68: 1586-1596; Charneau, et al., Virology (1994) 205: 247-253).

El papel de la afinidad del anticuerpo monoclonal para la detección cuantitativa equivalente de las proteínas nucleares de VIH generalmente no se ha buscado (Mehta, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.173.399; Gallarda, et al. documento WO93/21346; Zolla-Pazner, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.731.189; Mestan, et al., documento EP 0519866A1; Butman, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.210.181; Butman, et al., Patente de EE. UU. Nº 5.514.541;

Kortright, et al., Patente de EE. UU. N° 4.888.290; Kortright, et al., Patente de EE. UU. N° 4.886.742). Una afinidad media del anticuerpo monoclonal producido contra un antígeno proteico es de  $4,5 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$  (Mariuzza, et al., Rev. Biophys. Biophys. Chem. (1987) 16: 139-159; Karush, F. (1978) En, Comprehensive Immunology, ed. R.A. Good, S.B. Day, 5: 85-116. New York/London: Plenum). De manera adicional, aún no se han buscado estrategias de inmunización para aumentar la probabilidad para obtener monoclonales contra los epítomos compartidos.

Solamente combinando dos características imprevisibles de los anticuerpos monoclonales, la afinidad y la reactividad compartida, se puede esperar razonablemente la obtención de anticuerpos monoclonales que se pueden utilizar para detectar cantidades equivalentes de proteínas nucleares de VIH relacionadas pero no idénticas. La simple reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales probablemente sea insuficiente para conseguir una detección cuantitativa equivalente de proteínas nucleares de VIH. Más bien se necesita la reactividad compartida en combinación con una alta afinidad para conseguir el resultado deseado. La afinidad de un monoclonal por la proteína nuclear relacionada puede ser sustancialmente menor que la que se determina para la proteína nuclear inmunizante. En ese caso, el epítomo es más probablemente de reacción cruzada y la afinidad del anticuerpo por el epítomo de reacción cruzada puede limitar enormemente la utilidad de la detección por anticuerpo de una concentración relevante (es decir, de 25 pg de p24/ml de suero o plasma, Couroucé, et al., La Gazette de la Transfusion (1999) N° 155-Marzo-Abril) de la proteína nuclear de reacción cruzada.

No se conocen actualmente descripciones de inmunoensayos que utilicen solamente 2 anticuerpos monoclonales para conseguir la detección cuantitativa equivalente de proteínas nucleares de Grupo M de VIH-1, Grupo O de VIH, y VIH-2. Por lo tanto, dicho inmunoensayo es ciertamente deseable. Se han proporcionado dos o más monoclonales en combinación con sueros policlonales (inmunoglobulinas) como base para los inmunoensayos para detectar la proteína nuclear de VIH-1 o proteínas de VIH-1 y VIH-2 simultáneamente (Mehta, et al., Patente de EE. UU. N° 5.173.399; Butman, et al., Patente de EE. UU. N° 5.210.181; Butman, et al., Patente de EE. UU. N° 5.514.541; Kortright, et al., Patente de EE. UU. N° 4.888.290; Kortright, et al., Patente de EE. UU. N° 4.886.742; Gallarda, et al. WO93/21346). Por lo tanto, en vista de lo anterior, la bibliografía anterior falla en (a) describir o enseñar inmunoensayos restringidos a dos monoclonales para la detección cuantitativa equivalente de proteínas nucleares del Grupo M de VIH-1 y VIH-2, (b) describir o enseñar inmunoensayos restringidos a dos anticuerpos monoclonales para las detecciones cuantitativas equivalentes de proteínas nucleares del Grupo M de VIH-1, grupo O de VIH-1, y VIH-2, (c) enseñar métodos para saltarse las barreras de la afinidad de monoclonales que reconocen los antígenos de reacción cruzada que den lugar a la detección de las proteínas nucleares del grupo M y O de VIH-1, y VIH-2, y (d) anticuerpos monoclonales de alta afinidad contra epítomos compartidos como métodos y medios para detectar cantidades diagnósticamente relevantes y equivalentes de proteínas nucleares no idénticas del grupo M de VIH-1, grupo O de VIH-1 y VIH-2.

El documento WO90/14358 se refiere a anticuerpos monoclonales, líneas celulares que producen esos anticuerpos, los péptidos que comprenden los epítomos de esos anticuerpos y ensayos que utilizan esos anticuerpos y péptidos para la detección de productos genéticos de VIH-1 y VIH-2. En particular, los anticuerpos reaccionan con la proteína de la cápside p24/p26, se desvela el nonapeptido que comprende un epítomo conservado en VIH-1/VIH-2 y se desvela un ELISA de captura que utiliza una combinación de tres anticuerpos monoclonales que puede detectar simultáneamente VIH-1 y VIH-2.

El documento EP0345461 proporciona anticuerpos monoclonales que presentan reactividad específica con p24 de VIH-1. Un anticuerpo monoclonal denominado 31-42-19 que reconoce un único epítomo en la p24 de VIH-1 que no es inmunogénico en seres humanos. El 31-42-19 también reacciona con un epítomo de reacción cruzada antigénico en la p24 de VIH-2.

Otro anticuerpo monoclonal denominado 31-90-25 reconoce un epítomo en una región altamente inmunogénica de la p24 de VIH-1. La divulgación también proporciona líneas celulares capaces de producir estos anticuerpos monoclonales. La divulgación también incluye un inmunoensayo enzimático altamente sensible para la detección de la p24 de VIH-1 en fluidos biológicos, utilizando una mezcla de anticuerpos monoclonales. La divulgación también proporciona métodos para el uso de estos anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos anti-p24 de VIH-1 y antígeno p24 de VIH-2 en muestras biológicas.

El documento DE19727943 se refiere a un método para diagnosticar una infección por VIH mediante un inmunoensayo que detecta el antígeno p24 de VIH-1, VIH-1-subO y/o antígeno p26 de VIH-2, al menos un anticuerpo contra el intervalo env de VIH-1, VIH-1-subO y/o VIH-2 y al menos un anticuerpo contra el intervalo pol y/o gag de VIH-1, VIH-1-subO y/o VIH-2. La divulgación también se refiere a kits de reactivos y tiras de ensayo adecuados para dicho método de diagnóstico, y a anticuerpos monoclonales contra p24 y el uso de los mismos.

El J. Virol. (1991) 65(8): 4529-4533 describe anticuerpos monoclonales (Mab) que se originan contra las proteínas nucleares del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1; cepa de laboratorio HTVL-IIIB) y VIH-2 (cepa ROD) que se investigaron en una variedad de ensayos, por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), Inmunotinción de inmunotransferencia de Western, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, y ensayo de fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina. Los Mab se agruparon de acuerdo con sus reacciones cruzadas. Siete Mab específicos de VIH-1 reaccionaron exclusivamente con VIH-1, y cinco presentaban reactividad cruzada con VIH-2 y

virus de inmunodeficiencia de simios de macacos en ELISA. Cuatro de los 15 Mab contra VIH-2 reaccionaban solo con la proteína p26 de VIH-2.

Seis presentaban una reactividad cruzada con VIH-1, y cinco presentaban una reacción amplia con los tres virus. Se utilizó el solapamiento de péptidos de 30 aminoácidos de longitud derivados de la secuencia proteica de la p24 de VIH-1 en un sistema de mapeo de epítipo. Se pudieron definir tres diferentes regiones inmunogénicas (A, B, y C). Se mapearon las regiones específicas que reaccionaban de manera cruzada con Mab anti-VIH-1 y VIH-2 con oligopéptidos más cortos.

## Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a un antígeno del Virus 1 de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) y a un antígeno del Virus de la Inmunodeficiencia Humana 2 (VIH-2), que se denomina anticuerpo 115B-151 y se secreta por una línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito en la ATCC PTA-2809.

La presente invención proporciona además un reactivo de diagnóstico que comprende dicho anticuerpo monoclonal, que se denomina 115B-151 y se secreta por una línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito en la ATCC PTA-2809.

## Sumario de la divulgación

La presente divulgación se refiere a anticuerpos monoclonales y métodos para utilizar estos anticuerpos en la detección del Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (Grupos M y O) y Tipo 2, los agentes etiológicos del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), en el suero, plasma, u otros fluidos corporales. En particular, la divulgación engloba métodos diagnósticos que emplean anticuerpos monoclonales únicos de ratón, compatibles de alta afinidad que identifican epítipos compartidos no de reacción cruzada con el fin de detectar cantidades equivalentes de proteína nuclear de VIH-1 (p24) y proteína nuclear de VIH-2 (p26). Dichos anticuerpos también se pueden utilizar en ensayos que detectan el antígeno de VIH y en ensayos de combinación que detectan simultáneamente el antígeno de VIH y el anticuerpo contra VIH. En una realización preferida de la presente divulgación, solamente se necesitan dos anticuerpos monoclonales de ratón de amplia especificidad, alta afinidad, complementarios, para detectar cantidades equivalentes de proteínas nucleares del Grupo M de VIH-1, Grupo O de VIH-1, y VIH-2.

Los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación tienen altas afinidades (valores de  $K_{eq}$ ) suficientes para detectar de manera diagnóstica cantidades femtomolares relevantes de proteína nuclear de VIH; sin embargo, también poseen una amplia especificidad (es decir, una reactividad compartida) para la detección de cantidades equivalentes de proteínas nucleares relacionadas, pero no idénticas, del Grupo M de VIH-1, Grupo O de VIH-1, y VIH-2.

En particular, la presente divulgación engloba anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la proteína p24 de los grupos O y M del Virus-1 de la Inmunodeficiencia Humana y la proteína p26 del Virus-2 de la Inmunodeficiencia Humana. Estos anticuerpos monoclonales son, por ejemplo, 120A-270, 115B-151 (de acuerdo con la presente invención), 103-350, 115B-303, 117-289, y 108-394. La presente divulgación también incluye los hibridomas que producen estos anticuerpos.

Adicionalmente, la presente divulgación también engloba un método para detectar la presencia de uno o más antígenos seleccionados de entre el grupo que consiste en el antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2, en una muestra de ensayo que es sospechosa de contener uno o más de los antígenos. El método comprende las etapas de: a) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, 120A-270) que se une específicamente a epítipos compartidos de la proteína p24 del Virus-1 de la Inmunodeficiencia Humana y la proteína p26 del Virus-2 de la Inmunodeficiencia Humana durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno/anticuerpo; y b) detectar los complejos, indicando la presencia de los complejos, la presencia de al menos un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2, en la muestra de ensayo. El monoclonal de la etapa (a) puede ser, por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos monoclonales que se describen en el presente documento. Que puede estar marcado o no. Preferentemente, solamente se pone en contacto un anticuerpo monoclonal con la muestra de ensayo.

La presente divulgación también incluye un método para detectar simultáneamente la presencia de uno o más antígenos seleccionados de entre el grupo que consiste en el antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2, en una muestra de ensayo sospechosa de contener uno o más de los antígenos. El método comprende las etapas de: a) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína p24 del Virus-1 de la Inmunodeficiencia Humana y la proteína p26 del Virus-2 de la Inmunodeficiencia Humana durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno/anticuerpo; b) añadir un conjugado a los complejos antígeno/anticuerpo resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al antígeno, donde el conjugado comprende un anticuerpo unido a un

compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y c) detectar la presencia del antígeno que puede estar presente en la muestra de ensayo detectando una señal generada por el compuesto generador de señal, indicando la presencia de señal, la presencia de al menos un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2 en la muestra de ensayo.

El al menos un anticuerpo monoclonal de la etapa (a) puede ser por ejemplo, 120A-270, 115B-151 (de acuerdo con la presente invención), 117-289, 103-350, 108-394 o 115B-303. Preferentemente, se utiliza un anticuerpo monoclonal, en particular el 120A-270. El anticuerpo de la etapa (b) del conjugado puede ser por ejemplo, 120A-270, 115B-151 (de acuerdo con la presente invención), 117-289, 103-350, 108-394 o 115B-303, y preferentemente es 115B-151 (de acuerdo con la presente invención). Preferentemente, se utilizan el anticuerpo monoclonal 120A-270 (o 117-289) y el anticuerpo monoclonal 115B-151 (de acuerdo con la presente invención) como una pareja, tanto si 120A-270 (o 117-289) está en la fase sólida o está presente en el conjugado, como si 115B-151 (de acuerdo con la presente invención) está en la fase sólida o está presente en el conjugado.

Además, la presente divulgación también engloba un método para detectar la presencia de uno o más antígenos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en el antígeno de VIH-1 y el antígeno de VIH-2, en una muestra de ensayo sospechosa de contener uno o más de estos antígeno, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto simultáneamente: 1) al menos un anticuerpo monoclonal, que se une específicamente al antígeno p24 de VIH-1 y antígeno p26 de VIH-2, unido a un soporte sólido, 2) la muestra de ensayo, y 3) un reactivo indicador que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2 a los que se ha unido un compuesto generador de señal, para formar una mezcla; (b) incubar la mezcla durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos anticuerpo/antígeno/anticuerpo; (c) detectar la presencia de una señal medible generada por el compuesto generador de señal, indicando la presencia de la señal, la presencia de uno o más antígenos seleccionados de entre el grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2 en dicha muestra de ensayo.

El al menos un anticuerpo monoclonal de la etapa (a) puede ser por ejemplo, 120A-270, 115B-151 (de acuerdo con la presente invención), 117-289, 108-394, 115B-303 o 103-350, y preferentemente es 120A-270. El anticuerpo del conjugado de la etapa (b) puede ser, por ejemplo, 120A-270, 115B-151 (de acuerdo con la presente invención), 117-289, 108-394, 115B-303 o 103-350, y preferentemente es 115B-151 (de acuerdo con la presente invención). De nuevo, es importante señalar que cualquiera del uno o más anticuerpos monoclonales de la presente divulgación se puede utilizar en la fase sólida en conexión con cualquiera de los otros anticuerpos monoclonales de la divulgación (en el conjugado o la fase en solución). Se prefieren ciertas parejas de anticuerpos monoclonales, sin embargo, es preferible tener solo un anticuerpo monoclonal en la fase sólida.

La presente divulgación también incluye un kit para determinar la presencia de uno o más antígenos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2 en una muestra de ensayo que comprende: (a) al menos un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína p24 del Virus-1 de la Inmunodeficiencia Humana y la proteína p26 del Virus-2 de la Inmunodeficiencia Humana; y (b) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable. El al menos un anticuerpo monoclonal de (a) puede ser, por ejemplo, 120A-270, 115B-151 (de acuerdo con la presente invención), 117-289, 108-394, 115B-303, o 103-350, y preferentemente es 120A-270. El anticuerpo de (b) puede ser, por ejemplo, 120A-270, 115B-151 (de acuerdo con la presente invención), 117-289, 108-394, 115B-303, o 103-350, y preferentemente es 115B-151 (de acuerdo con la presente invención).

La presente divulgación incluye también un reactivo de diagnóstico que comprende al menos un anticuerpo monoclonal que se selecciona de entre el grupo que consiste en 120A-270, 115B-151 (de acuerdo con la presente invención), 117-289, 103-350, 108-394 y 115B-303.

De manera adicional, la presente divulgación engloba epítomos o péptidos aislados que tienen la secuencia de aminoácidos que se presenta en SEQ ID NO: 1-6.

La presente divulgación también incluye métodos para detectar simultáneamente tanto antígenos como anticuerpos contra VIH-1 y/o VIH-2 en una muestra del paciente. Uno de dichos métodos incluye la detección de 1) uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en anticuerpos contra VIH-1 y anticuerpos contra VIH-2, y 2) uno o más antígenos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2, en una muestra de ensayo sospechosa de contener uno o más de los anticuerpos y uno o más de dichos antígenos, que comprende las etapas de: a) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un antígeno de VIH-1 que se une a un anticuerpo contra VIH-1 durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno de VIH-1/anticuerpo contra VIH-1; b) detectar los complejos antígeno de VIH-1/anticuerpo contra VIH-1 en la muestra de ensayo, indicando la presencia de complejos, la presencia de anticuerpos anti VIH-1 en la muestra de ensayo; c) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un antígeno de VIH-2, que se une a un anticuerpo contra VIH-2 durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno de VIH-2/anticuerpo contra VIH-2; d) detectar los complejos antígeno de VIH-2/anticuerpo contra VIH-2, indicando la presencia de complejos, la presencia del anticuerpo contra VIH-2 en la muestra de ensayo; e) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína p24 del Virus-

1 de la Inmunodeficiencia Humana y la proteína p26 del Virus-2 de la Inmunodeficiencia Humana durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de los complejos antígeno/anticuerpo; y f) detectar los complejos, indicando la presencia de los complejos, la presencia de al menos un antígeno que se selecciona de entre el grupo que consiste en el antígeno de VIH-1 y el antígeno de VIH-2, en la muestra de ensayo. De nuevo, es preferible utilizar ciertas parejas de anticuerpos monoclonales en conexión con la detección de antígenos de VIH-1 y VIH-2 (por ejemplo, 120A-270 y 115B-151, el último de acuerdo con la presente invención).

Otro método englobado por la presente divulgación implica la detección de 1) uno o más anticuerpos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en anticuerpo contra VIH-1 y anticuerpo contra VIH-2, y 2) uno o más de los antígenos seleccionados de entre el grupo que consiste en antígenos de VIH-1 y antígeno de VIH-2, en una muestra de ensayo sospechosa de contener uno o más de los anticuerpos y uno o más de los antígenos, que comprende las etapas de: a) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un antígeno de VIH-1 que se une específicamente a un anticuerpo contra VIH-1 durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno de VIH-1/anticuerpo contra VIH-1; b) añadir un conjugado a los complejos de antígeno de VIH-1/anticuerpo contra VIH-1 resultantes, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al anticuerpo unido, donde el conjugado comprende un antígeno unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; c) detectar el anticuerpo contra VIH-1 que pueda estar presente en la muestra de ensayo, detectando una señal generada por el compuesto generador de señal, indicando la presencia de la señal, la presencia del anticuerpo contra VIH-1 en la muestra de ensayo; d) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un antígeno de VIH-2 que se une específicamente a un anticuerpo contra VIH-2 durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos de antígeno de VIH-2/anticuerpos contra VIH-2; e) añadir un conjugado a los complejos antígeno de VIH-2/anticuerpo contra VIH-2 durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al anticuerpo unido, donde el conjugado comprende un antígeno unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal; f) detectar el anticuerpo contra VIH-2 que pueda estar presente en la muestra de ensayo detectando una señal generada por el compuesto generador de señal, indicando la presencia de la señal, la presencia de anticuerpo contra VIH-2 en la muestra de ensayo; g) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína p24 del Virus-1 de la Inmunodeficiencia Humana y proteína p26 del Virus-2 de la Inmunodeficiencia Humana durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno/anticuerpo; h) añadir un conjugado a los complejos antígeno/anticuerpo resultantes, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al antígeno unido, donde el conjugado comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; e i) detectar la presencia del antígeno que pueda estar presente en dicha muestra detectando una señal generada por el compuesto generador de señal, indicando la presencia de la señal, la presencia de al menos un antígeno que se selecciona de entre el grupo que consiste en el antígeno de VIH-1 y el antígeno de VIH-2 en la muestra de ensayo. De nuevo, las parejas preferidas de anticuerpos monoclonales que se pueden utilizar en el ensayo son las que se han descrito anteriormente; sin embargo, se pueden utilizar también otras parejas.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a ilustra el alineamiento de secuencia de aminoácidos de p24 del grupo M de VIH-1 y el grupo O de VIH-1. Las características estructurales (por ejemplo, hélices A-J) determinadas a partir de la estructura de la p24 del grupo M se muestra por encima del alineamiento de secuencia. Los péptidos sintéticos de p24 del grupo M y el grupo O para los estudios de mapeo se diseñaron y marcaron de acuerdo con la secuencia del grupo M o grupo O y se numeraron respectivamente.

La Figura 1b ilustra el alineamiento de secuencia de la p24 del grupo M de VIH-1, grupo O de VIH-1 y p26 de VIH-2.

Las Figuras 2a y 2b ilustran la unión de los anticuerpos monoclonales 103-350, 117-289, 115-303, 120A-270, y 115B-151 (de acuerdo con la invención) a los péptidos sintéticos de p24.

La Figura 3 ilustra la localización de los clones de eliminación derivados de la p24 de los grupos M y O de VIH-1.

La Figura 4 ilustra los resultados de las transferencias de Western utilizadas para mapear la unión de los anticuerpos monoclonales 115B-151 (de acuerdo con la invención) y 108-394 a las regiones de p24.

La Figura 5 resume los epítomos de p24 de VIH-1 reconocidos por los anticuerpos monoclonales contra p24.

La Figura 6 ilustra la sensibilidad cuantitativa que se consigue para la p24 del grupo M de VIH-1 utilizando 120A-270 en la fase sólida y 115B-151 (de acuerdo con la invención) en la fase en solución.

La Figura 7 ilustra la sensibilidad cuantitativa que se consigue para la p24 del grupo O de VIH-1 utilizando 120A-270 en la fase sólida y 115B-151 (de acuerdo con la invención) en la fase en solución.

La Figura 8 ilustra la sensibilidad cuantitativa que se consigue para p26 de VIH-2 utilizando 120A-270 en la fase sólida y 115B-151 (de acuerdo con la invención) en la fase en solución.

#### Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a nuevos anticuerpos monoclonales contra la proteína p24 de VIH-1 y la proteína p26 de VIH-2, los métodos para utilizar estos anticuerpos monoclonales, y los kits que contienen estos anticuerpos. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a anticuerpos monoclonales a los que se hace referencia en el presente documento como 120A-270 (por ejemplo, el clon 108), 115B-151 (por ejemplo, el clon 423) (de acuerdo

con la invención), y 117-289 (por ejemplo, el clon 555). Adicionalmente, la presente invención incluye anticuerpos monoclonales a los que se hace referencia en el presente documento como 103-350 (por ejemplo, el clon 474), 108-394 (por ejemplo, el clon 470) y 115B-303 (por ejemplo, el clon 620).

La presente divulgación no solo incluye los anticuerpos monoclonales a los que se hace referencia anteriormente sino que incluye también las nuevas líneas celulares de hibridoma que producen estos anticuerpos. Más específicamente, la línea celular \_ produce el anticuerpo monoclonal 120A-270, la línea celular PTA-2809 produce el anticuerpo monoclonal 115B-151 (de acuerdo con la invención), la línea celular PTA-2806 produce el anticuerpo monoclonal 117-289, la línea celular PTA-2808 produce el anticuerpo monoclonal 103-350, la línea celular PTA-2807 produce el anticuerpo monoclonal 108-394, y la línea celular PTA-2810 produce el anticuerpo monoclonal 115B-303. Las líneas celulares que producen los anticuerpos, con la excepción de la línea celular que producía el anticuerpo monoclonal 120A-270, se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, bajo los términos del Tratado de Budapest el 13 de diciembre de 2000 y estaban de acuerdo con los números de la ATCC señalados anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación o fragmentos de los mismos se pueden utilizar en inmunoensayos para la detección de VIH-1 (Grupos M y O) y VIH-2, simultáneamente. (Para los fines de la presente divulgación, un "fragmento" se define como una subunidad del anticuerpo monoclonal que reacciona de la misma manera, funcionalmente, que el anticuerpo completo con respecto a las propiedades de unión). En particular, cuando se utilizan los anticuerpos monoclonales 120A-270 y 115B-151 (de acuerdo con la invención), o los anticuerpos monoclonales 117-289 y 115B-151 (de acuerdo con la invención) en combinación, en un inmunoensayo, por ejemplo, en un ensayo sándwich, se puede detectar mínimamente el antígeno nuclear (p24) de los subtipos A, B, C, D, E, F, G y O de los grupos M y O de VIH-1, y el antígeno nuclear (p26) de VIH-2 en una muestra de paciente. De hecho, se pueden detectar cantidades de menos de 25 picogramos (es decir, picogramos de antígeno nuclear/ml de suero o plasma) del antígeno p24 de VIH-1 y el antígeno p26 de VIH-2 utilizando las combinaciones de anticuerpos monoclonales descritos anteriormente. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación tienen un alto grado de sensibilidad así como una amplia especificidad. En particular, la propiedad única de estos anticuerpos es que ellos reconocen antígenos nucleares relacionados, pero no idénticos, con una afinidad aproximadamente equivalente (es decir, una sensibilidad cuantitativamente equivalente), que indica que reconocen epítopos compartidos impredecibles, y por lo tanto presentan reactividad compartida, más que los epítopos de reacción cruzada típicos y esperados y que por lo tanto presentan reactividad cruzada. (Para los fines de la presente divulgación, "reactividad cruzada" se define como la unión de un anticuerpo a determinantes estructuralmente diferentes en antígenos diferentes. La afinidad del anticuerpo por un epítipo de reacción cruzada (es decir, un antígeno) es menor que la del epítipo inmunogénico (es decir, un antígeno) o epítipo compartido. "Reactividad compartida" se define como la unión de un anticuerpo a determinantes estructuralmente idénticos en diferentes antígenos. La afinidad del anticuerpo por un epítipo compartido es equivalente a la afinidad por el epítipo inmunogénico (es decir, un inmunógeno). También se debería señalar que las parejas de anticuerpos monoclonales son compatibles, es decir, cada anticuerpo monoclonal de la pareja mapea un epítipo o determinante antigénico diferente en la(s) proteína(s) nuclear(es). La unión de un anticuerpo de la pareja no interfiere la unión del segundo anticuerpo de la pareja.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo monoclonal 120A-270 o un fragmento del mismo, de la realización preferida, está revistiendo la fase sólida (por ejemplo, una micropartícula, un pocillo de microtitulación, una perla, etc.); sin embargo, también se puede utilizar el 115B-151 (de acuerdo con la invención) o 117-289 o fragmentos de los mismos. La muestra de ensayo se pone en contacto entonces con el anticuerpo monoclonal o el fragmento del mismo de manera que, si el antígeno p24 o el antígeno p26 están presentes en la muestra del paciente se formarán entonces complejos antígeno/anticuerpo como una primera mezcla. (Por ejemplo, se pueden formar ambos complejos anticuerpo monoclonal/antígeno p24 y anticuerpo monoclonal/antígeno p26 si el paciente tiene ambos VIH-1 y VIH-2). Entonces se añade un conjugado que comprende (a) un anticuerpo sonda, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 115B-151 (de acuerdo con la invención) que se une a un epítipo distinto y compatible con el epítipo unido por 120A-270) unido a (b) un compuesto generador de señal. Se formarán entonces complejos anticuerpo/antígeno/anticuerpo sonda como una segunda mezcla. El antígeno de VIH-1 y/o VIH-2 se detectan entonces en la muestra detectando la presencia de la señal generada y por lo tanto los complejos anticuerpo/antígeno/anticuerpo sonda. La cantidad de antígeno(s) en la muestra de ensayo también se puede calcular, ya que la señal generada es proporcional a la cantidad de antígeno de la muestra.

Otra manera de detectar los complejos formados es utilizar un conjugado que comprende un tercer anticuerpo unido a un compuesto generador de señal. En particular, una vez que los complejos anticuerpo/antígeno/ anticuerpo descritos anteriormente se han formado (es decir, siendo el último anticuerpo el 2º anticuerpo que no está marcado), se puede añadir entonces un conjugado que se une al "2º" anticuerpo sin marcar en solución. El conjugado puede comprender, por ejemplo, un antígeno o un anti-anticuerpo capaz de unirse al segundo anticuerpo unido (por ejemplo, un anticuerpo anti-115B-151 o un anticuerpo contra el anticuerpo sonda) unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable. La detección de la señal por lo tanto indica la presencia de los complejos y por lo tanto la presencia del antígeno en la muestra. La señal generada actualmente es proporcional a la cantidad del antígeno presente en la muestra. (Véase por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 6.015.662). El diseño de los ensayos depende de las afinidades y especificidades de los anticuerpos que se utilizan, la precisión de los

resultados obtenidos, conveniencia, naturaleza de la fase sólida, etc. (Véase la Patente de EE. UU. Nº 5.104.790 para una exposición de formatos de ensayo de diferentes antígenos).

De manera adicional, se debería señalar también que el anticuerpo de captura inicial que se utiliza en el inmunoensayo puede unirse covalente o no covalentemente (por ejemplo, iónica, hidrófoba, etc.) a la fase sólida. Los agentes de unión para la unión covalente se conocen en la técnica y pueden ser parte de la fase sólida o derivados de estos antes del revestimiento. Ejemplos de fases sólidas que se utilizan en los inmunoensayos son materiales porosos y no porosos, partículas de látex, partículas magnéticas, micropartículas, perlas, membranas, pocillos de microtitulación y tubos de plástico. La elección del material de la fase sólida y el método para marcar el antígeno o el anticuerpo presente en el conjugado, si se desea, se determina basándose en las características de actuación del formato de ensayo deseado.

Como se ha señalado anteriormente, el conjugado (o reactivo indicador) comprenderá un anticuerpo (o quizá un anti-anticuerpo, dependiendo del ensayo), unido a un compuesto generador de señal o marcador. Este compuesto generador de señal o "marcador" es detectable por sí mismo o se puede hacer reaccionar con uno o más compuestos adicionales para generar un producto detectable. Ejemplos de compuestos generadores de señal incluyen cromógenos, radioisótopos (por ejemplo, compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, acridinio), partículas (visibles o fluorescentes), ácidos nucleicos, agentes complejantes, o catalíticos tales como enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano rusticano, beta-galactosidasa y ribonucleasa). En el caso del uso de enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano rusticano), la adición de un sustrato cromo-, fluoro- o lumogénico da como resultado la generación de una señal detectable. También pueden ser útiles otros sistemas de detección tales como fluorescencia resuelta en el tiempo, fluorescencia de reflexión interna, amplificación (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa) y espectroscopia de Raman.

Otro tipo de ensayo en el que se pueden utilizar los presentes anticuerpos monoclonales implica poner en contacto simultáneamente: 1) un anticuerpo monoclonal (unido a un soporte sólido), 2) la muestra de ensayo y 3) un reactivo indicador que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo (por ejemplo, 115B-151, de acuerdo con la invención, que se une específicamente al antígeno de VIH-1 y VIH-2) al que se une el compuesto generador de señal, para formar una mezcla. La mezcla se incuba entonces durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos anticuerpo/antígeno/anticuerpo. La presencia, si existe, de antígenos de VIH-1 y VIH-2 en la muestra de ensayo y la captura en la fase sólida se determina detectando la señal medible generada por el compuesto generador de señal. La cantidad de antígeno presente en la muestra de ensayo es proporcional a la señal generada. En este ensayo o los que se han descrito anteriormente, los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación se pueden utilizar como la fase de captura o como parte del reactivo indicador en solución (es decir, el reactivo que comprende un anticuerpo y un compuesto generador de señal). Dichos procedimientos diagnósticos, incluyendo los que se describen anterior y posteriormente, se conocen bien en la técnica (véase Immunological Methods, Vols. I y II, 1979 y 1981, Eds., Lefkovits y Pernis, Academic Press, New York; Monoclonal Antibodies, 1982, eds., Kennett et al., Plenum Press, New York; y Handbook of Experimental Immunology, 1978, ed., Weir, Blackwell Scientific Publications, St. Louis, MO).

Se debería señalar que los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación se pueden utilizar preferentemente solos, como un único anticuerpo de captura, o solos como una única sonda y/o anticuerpo conjugado. Sin embargo, también se pueden utilizar en parejas o en tríos en los ensayos descritos anteriormente. Además, se pueden utilizar combinaciones de los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación (y fragmentos de los mismos) con otros anticuerpos monoclonales que tengan especificidades por los epítomos de VIH-1 y/o VIH-2, distintas de las especificidades de los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación. Por lo tanto, los presentes anticuerpos monoclonales pueden actuar como componentes de una mezcla o "cóctel" de anticuerpo contra VIH-1 y/o VIH-2. Por lo tanto, por ejemplo, este cóctel puede incluir un anticuerpo monoclonal de la presente divulgación que detecta la p24 de VIH-1 y la p26 de VIH-2 (por ejemplo, el 120A-270) y un anticuerpo monoclonal que detecta un determinante antigénico de la envoltura del VIH en la proteína transmembrana o glucoproteína extracelular. De esta manera, se puede ser capaz de detectar varios determinantes antigénicos de diferentes proteínas de uno o más virus (por ejemplo, VIH-1 y VIH-2) simultáneamente.

También, se debería señalar que los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación se pueden utilizar en un ensayo de combinación que detecta: 1) antígenos, tales como los descritos anteriormente (por ejemplo, p24 y p26) y 2) anticuerpos contra VIH (por el uso de, por ejemplo, antígenos de envoltura (por ejemplo gp41 de los grupos M y O de VIH-1 y gp36 de VIH-2). Cualquiera de dichos ensayos de combinación, que utilice los anticuerpos monoclonales de la presente invención, se considera que está en el alcance de la divulgación.

Ejemplos de fluidos biológicos que se pueden ensayar con los inmunoensayos anteriores incluyen plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, saliva, lágrimas, lavados nasales o extractos acuosos de tejidos y células. Las muestras de ensayo también pueden comprender virus completos inactivados o parcialmente purificados o antígenos p24 o p26 recombinantes.

También se debería señalar que los anticuerpos monoclonales a los que se hace referencia anteriormente pueden utilizarse, cuando se marcan apropiadamente, como sondas competitivas contra los anticuerpos del núcleo de VIH-1

y 2 en muestras de suero por la unión con p24 de VIH-1 y p26 de VIH-2 derivados recombinantemente.

De manera adicional, los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación o fragmentos de los mismos se pueden utilizar en sistemas de detección utilizando células fijadas o tejidos fijados, con el marcado apropiado de cada anticuerpo monoclonal. En particular, la muestra de tejido se pone en contacto con un conjugado que comprende un compuesto generador de señal unido a uno de los anticuerpos monoclonales de la presente invención con el fin de formar una mezcla. La mezcla se incuba entonces durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se formen los complejos antígeno/anticuerpo. La presencia del antígeno presente en la muestra se determina detectando la señal generada. Los anticuerpos se pueden utilizar también para purificar el antígeno p24 de VIH-1 y p26 de VIH-2, por ejemplo, por cromatografía de afinidad.

Además, los anticuerpos de la divulgación se pueden unir a matrices y utilizarse para la purificación por afinidad de antígenos específicos de VIH-1 y/o VIH-2 de, por ejemplo, cultivos celulares, o tejidos biológicos tales como la sangre o el hígado. Los anticuerpos monoclonales, por ejemplo, se pueden unir o inmovilizar en un sustrato o soporte. La solución que contiene los determinantes antígenicos de VIH se pone en contacto entonces con el anticuerpo inmovilizado durante un tiempo y en condiciones adecuadas para la formación de complejos inmunitarios entre el anticuerpo y los polipéptidos que contienen los determinantes p24 y p26. El material no unido se separa de los complejos inmunitarios unidos. Los complejos o fragmentos antígenicos se separan entonces del soporte.

Uno o más de los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación, y preferentemente las parejas sugeridas anteriormente, son particularmente adecuadas para su uso en forma de kit. El kit puede comprender uno o más envases tales como viales o botellas, conteniendo cada envase una pareja de los anticuerpos monoclonales, o como cócteles de anticuerpos monoclonales. Estos kits también pueden contener viales o envases de otros reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo, tales como de lavado, procesamiento y reactivos indicadores.

De manera adicional, la presente divulgación también incluye una vacuna que comprende uno o más de los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación y un adyuvante farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, el adyuvante de Freund) que se puede administrar a individuos infectados por VIH (es decir, una inmunización pasiva). Además, los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden servir de manera profiláctica para la administración a individuos no infectados, con alto riesgo, tales como los trabajadores del sistema sanitario.

También se debería señalar que los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación también pueden servir como herramientas de investigación para el mapeo de epítomos de las proteínas p24 y p26 de VIH. Además, se debería señalar que los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación no solo se unen a proteínas y precursores proteicos de aislados clínicos de VIH que contienen la región diana o regiones de determinantes antígenicos, adicionalmente, los anticuerpos se unen a proteínas recombinantes y análogos sintéticos de las proteínas que contienen los determinantes antígenicos. Por lo tanto, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación se pueden utilizar en experimentos de unión que impliquen proteínas recombinantes y análogos sintéticos de la p24 de VIH-1 y p26 de VIH-2.

De manera adicional, los anticuerpos de la presente divulgación que están sin marcar se pueden utilizar en ensayos de aglutinación o se pueden utilizar en combinación con anticuerpos marcados que sean reactivos con los anticuerpos monoclonales, tales como los anticuerpos específicos para inmunoglobulinas.

La presente divulgación también comprende un método para tratar un mamífero infectado con el VIH-1 y/o VIH-2 que comprende la administración a un mamífero, que necesita dicho tratamiento, de una cantidad eficaz de uno o más de los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación en forma de una composición farmacéutica, como se describe directamente posteriormente. Una cantidad farmacéuticamente eficaz significa cualquier cantidad del compuesto, que cuando se incorpora en la composición farmacéutica, será eficaz para inhibir la replicación del VIH y de esta manera tratará el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), pero menor que la cantidad que sería tóxica para el sujeto.

De manera adicional, la presente divulgación engloba composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéutico es cualquier sustancia compatible, no tóxica adecuada para suministrar uno o más anticuerpos monoclonales al paciente. Por ejemplo, se pueden utilizar como vehículo el agua estéril, alcohol, grasas, ceras y sólidos inertes. La composición puede contener también anticuerpos monoclonales que se unen a proteínas o glucoproteínas de VIH distintas de p24 y/o p26. Además, la composición farmacéutica se puede administrar sola o en conjunción con otros agentes anti-retrovíricos. (Véase Mitsuya et al., Nature 325:773-778 (1987)). Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar por vía oral o por vía parenteral (es decir, subcutánea, intramuscular o intravenosa).

Además se debería señalar que se pueden utilizar uno o más de los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación para generar anticuerpos quiméricos para un uso terapéutico, por ejemplo, o como calibradores o controles de los ensayos.

Como todos los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación se unen tanto a la p24 de VIH-1 como a la p26 de VIH-2, como se prueba con los datos presentados en la Tabla 5, por ejemplo, se pueden utilizar uno o más de los anticuerpos monoclonales en los ensayos diagnósticos, kits, composiciones y métodos descritos anteriormente. Ciertamente, se prefieren los que tienen especificidades y capacidades de unión más fuertes (con respecto a p24 y p26).

La presente divulgación se puede ilustrar por el uso de los siguientes ejemplos no limitantes:

### Ejemplo 1

#### Selección de inmunógenos

Las estrategias de inmunización incluían los antígenos del grupo O de VIH-1 y el grupo M del VIH-1 para dar lugar a la respuesta inmunitaria hacia el reconocimiento de ambos epítomos compartidos en los antígenos nucleares de ambos grupos de VIH-1. Se utilizaron tres inmunógenos diferentes de VIH-1 en distintas combinaciones para desarrollar una respuesta anti-p24 de VIH-1 en el animal huésped. Dos de los antígenos del grupo M de VIH-1 fabricados por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) se derivaban de lisados de virus completos mientras que la proteína p24 nativa del grupo M de VIH-1 (p24M) se purificó de lisados víricos.

El tercer inmunógeno era un antígeno p24 recombinante (rp24-O) derivado del gen gag del aislado HAM112 del grupo O de VIH-1. El gen de p24 de HAM112 se clonó en el vector lambda PL y se expresó en *E. coli*. La construcción, aumento a escala y purificación del antígeno recombinante se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos publicados para las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* (Seetharam, R. y Sharma, S.K., (eds), 1991. 'Purification and Analysis of Re-combinant Proteins', Marcel Dekker. New York, NY). La verificación de la secuencia de aminoácidos con respecto a los métodos publicados confirmó la integridad del producto. (Van den Haesevelde et al., 1994. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. J. Virol. 68:1586).

### Ejemplo 2

#### Inmunización de ratones

Los modelos animales seleccionados para el desarrollo de hibridomas eran tres estirpes de ratones, CAF1, RBf/dn, y BALB/c. Los ratones eran hembras, con una edad de 6-8 semanas, adquiridas en el Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Con el fin de producir anticuerpos monoclonales anti-p24 de VIH-1 con alta afinidad, se utilizaron dos estrategias diferentes. Los hibridomas que secretaban anticuerpos monoclonales (Mab) anti-p24 103-350-474, 108-394-470, 115B-303-620, 115B-151-423 (de acuerdo con la invención), y 117-289-555 se produjeron a partir de ratones que se inmunizaban dos veces con rp24-O o p24-M o la mezcla de ambos rp24-O y p24M por vía subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.). Los ratones se dejaron en reposo durante 4-12 meses para la maduración de la afinidad y se reforzaron con el inmunógeno por vía intraesplénica (i.s.) tres días antes de la fusión. Se produjo el 120A-270-108 a partir de ratones BALB/c que se habían hiperinmunizado semanalmente seis veces con una dosificación baja de p24-M nativa purificada que se aplicaba alternando entre administración intraperitoneal (i.p.) y administración subcutánea.

Los procedimientos de inmunización se describen en detalle de la siguiente manera:

El hibridoma 103-350-474 se produjo a partir de la fusión celular nº 103. El día 1, el ratón CAF1 nº 1555 recibió 10 ug de antígeno rp24-O en 0,2 ml de Adyuvante Completo de Freund (CFA) (Difco Laboratories, Detroit, MI) aplicado por vía subcutánea. El día 56, el ratón recibió 10 ug de antígeno rp24-O en 0,2 ml de Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) (Difco Laboratories, Detroit, MI) aplicado por vía intramuscular (i.m.). El día 74, se extrajo sangre del ratón para la evaluación del título de anticuerpo anti-VIH-1 por un inmunoensayo ligado a enzimas (EIA) indirecto. El día 186, el ratón se reforzó i.s. con 25 ug de lisado vírico del grupo M de VIH-1 en solución salina normal.

El hibridoma 108-394-470 se produjo a partir de la fusión celular nº 108. El día 1, el ratón CAF1 nº 1556 recibió 10 ug del antígeno rp24-O en 0,2 ml de CFA aplicado por vía s.c. El día 56 el ratón recibió 10 ug del antígeno rp24-O en 0,2 ml de IFA aplicado por vía i.m. El día 74, se extraía sangre del ratón para la evaluación del título de anticuerpos anti-VIH-1 por EIA indirecto. El día 270, el ratón se reforzó por vía i.s. con 45 ug de p24 nativa purificada del grupo M del VIH-1 en solución salina normal.

Los hibridomas 115B-151-423 (de acuerdo con la invención) y 115B-303-620 se produjeron a partir de la fusión celular nº 115B. El día 1, el ratón CAF1 nº 1563 recibió 10 ug de antígeno rp24-O en 0,2 ml de CFA aplicado por vía s.c. El día 210, el ratón recibió una mezcla de 10 ug de rp24-O y 10 ug de p24M en 0,2 de IFA aplicado por vía s.c. El día 235, se extrajo sangre del ratón para la evaluación del título de anticuerpo anti-VIH-1 por EIA indirecto. El día 375, el ratón se reforzó por vía i.s. con una mezcla de 10 ug de rp24-O y 10 ug de p24M en solución salina normal.

El hibridoma 117-289-555 se produjo a partir de la fusión celular nº 117. El día 1, el ratón RBf/dn nº 1545 recibió 10 ug del antígeno rp24-O en 0,2 ml de CFA aplicado por vía s.c. El día 56, el ratón recibió una mezcla de 10 ug de rp24-O en 0,2 ml de IFA aplicado por vía i.m. El día 74, se extrajo sangre del ratón para la evaluación del título de anticuerpo anti-VIH-1 por EIA indirecto. El día 392, el ratón se reforzó por vía i.s. con una mezcla de 45 ug de rp24-O y p24M nativa purificada en solución salina normal.

El hibridoma 120A-270-108 se produjo a partir de la fusión celular nº 120A de un ratón BALB/c hiperinmunizado nº 7 que recibió 0,2 ml de un inmunógeno que contenía 10 ug de antígeno p24M nativo purificado y 4 ug de extracto de *S. typhimurium* (RIBI Immunochemicals, RiBi Immuno Chem Research, Hamilton, Montana) aplicado por vía i.p. en día 1, por vía s.c. el día 7, y por vía i.p. el día 14. El día 21, se extrajo sangre del ratón para la evaluación del título de anticuerpo anti-p24 de VIH-1 por EIA indirecto. Los días 28, 35, y 42, el ratón recibió 5 ug de antígeno p24M nativo purificado en 0,2 ml de adyuvante RIBI aplicado por vía s.c., i.p., y s.c., respectivamente. El día 49 se extrajo sangre del ratón una segunda vez para la evaluación del título de anticuerpo anti-VIH-1 por EIA indirecto. El día 77, tres días antes de la fusión, el ratón se reforzó por vía i.s. con 50 ug de antígeno p24M nativo purificado en solución salina normal.

### Ejemplo 3

#### Evaluación del título de anticuerpo anti-p24 de los ratones inmunizados

Se utilizaron inmunoensayos ligados a enzimas (EIA) sándwich de unión indirecta y directa para evaluar los títulos de anticuerpo anti-VIH-1 a partir de los ratones inmunizados. (El EIA sándwich directo se llevó a cabo con una cantidad limitada de antígeno nuclear para detectar solamente los anticuerpos con alta afinidad). Los sueros de los ratones intactos o inmunizados se diluyeron en serie con 10 mM de tampón de fosfato sódico (PBS), pH 7,4, que contenía un 5 % de albúmina sérica bovina (BSA) y un 0,03 % de azida sódica como conservante. Los procedimientos detallados de ensayo se describen posteriormente. La evaluación de los títulos de anticuerpo anti-p24 de los ratones inmunizados se muestra en la Tabla 1a a partir del EIA de unión indirecta y la Tabla 1b a partir del EIA sándwich directo.

Tabla 1a. Evaluación de los títulos de anticuerpo anti-p24 por EIA indirecto

| Lectura a A490 nm |                                 |                        |        |       |                |
|-------------------|---------------------------------|------------------------|--------|-------|----------------|
| Fusión nº         | ID del Animal                   | Dilución de los sueros | rp24-O | p24-M | BSA de control |
| 103               | CAf1 nº 1555                    | 1/24.300               | 1,219  | 1,156 | 0,008          |
| 108               | CAf1 nº 1556                    | 1/24.300               | 1,157  | 1,109 | 0,005          |
| 117               | RBf/dn nº 1545                  | 1/900                  | 0,462  | 0,600 | 0,019          |
| 120A              | BALB/c nº 7                     | 1/100.000              | NT     | 1,709 | 0,025          |
|                   | Suero de ratones pre-extracción | 1/900                  | 0,036  | 0,093 | 0,018          |

Tabla 1b. Evaluación de los títulos de anticuerpo por EIA sándwich directo

| Lectura a A490 nm |                                 |                        |             |             |
|-------------------|---------------------------------|------------------------|-------------|-------------|
| Fusión nº         | ID del Animal                   | Dilución de los sueros | Lisado de M | Lisado de O |
| 115B              | CAf1 nº 1563                    | 1/8.100                | 0,540       | 0,401       |
| 120A              | BALB/c nº 7                     | 1/1.000                | 1,579       | 0,762       |
|                   | Suero de ratones pre-extracción | 1/1.000                | 0,163       | 0,162       |

Para el EIA de unión directa, en resumen, los sueros diluidos se hicieron reaccionar con pocillos de microtitulación revestidos con 100 ul del antígeno p24M (es decir, p24 del grupo M) o rp24-O (es decir, p24 recombinante del grupo O) a 3 ug/ml en PBS o la mezcla de p24M y rp24-O y después se bloquearon con un 2 % de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente (TA) en un agitador de placas de microtitulación (Lab-Line Instruments, Melrose, IL), la placa se lavó 3 veces con agua destilada utilizando una lavadora de placas (Skanwash, Skatron Instruments, Sterling, VA). Se añadieron cien ul de conjugado al 0,2 ug/ml de anticuerpo de cabra anti-IgG+IgM de ratón-peroxidasa de rábano rusticano (HRPO) (KPL, Gaithersburg, MD) a cada pocillo de la placa. Tras la incubación durante 30 minutos a TA, la placa se lavó 3 veces (como anteriormente). Se añadió una solución de sustrato enzimático o-fenilenodiamina:2HCl (OPD) a cada pocillo para desarrollar la reacción de color durante 5 minutos en oscuridad a TA. La reacción se detuvo por adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N en cada pocillo. La placa se leyó a A490 nm en un lector de placas de microtitulación (Titertek multiwell EIA reader, ICN, Huntsville, AL).

Para el EIA sándwich indirecto, se revistieron los pocillos de microtitulación con 100 ul por pocillo de anticuerpos de cabra anti-IgG+M de ratón (KPL) a 10 ug/ml durante una noche a 2-8 °C. La placa se lavó 3 veces con agua destilada utilizando una lavadora de placas (Skanwash, Skatron Instruments, Sterling, VA) y después se bloqueó con un 2 % de BSA en PBS durante 30 minutos a TA. Se añadieron porciones de cien ul de fluidos del cultivo a los

pocillos y se incubó la placa durante 1 hora a TA en un agitador de placas. Los anticuerpos anti-p24 secretados en los fluidos del cultivo se capturaron en la fase sólida revestida con el anticuerpo de cabra anti-IgG+M de ratón. Tras el lavado, se añadieron porciones de 100 µl de lisado vírico de VIH-1 a 100 pg/ml en cada pocillo y la placa se incubó durante una hora a TA en un agitador de placas. Tras el lavado, se añadieron 100 µl de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-HRPO (KPL) a cada pocillo, y se incubó la placa durante 30 minutos a TA. Tras el lavado final, se añadió el OPD cromógeno como se ha descrito anteriormente.

#### Ejemplo 4

##### Fusión celular

Tres días después del refuerzo pre-fusión con antígeno, se sacrificaron los ratones y se fragmentaron los bazo en células únicas. Las suspensiones de células únicas se trataron con un 0,83 % de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para eliminar los glóbulos rojos, y después se mezclaron con células SP2/0 con una relación de 10:1 de SP2/0:células esplénicas. Las células mezcladas se centrifugaron, se lavaron una vez con medio libre de suero, y luego se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante se retiró del aglomerado celular. Se utilizó como fusógeno el polietilenglicol (PEG) para formar híbridos de las células esplénicas inmunitarias con la línea celular SP2/0 (HPRT neg.) [Kohler y Milstein, Nature (1975) 256:494, y revisado en Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications ed. Hurrell (CRC Press, Inc., 1982)]. En resumen, la fusión de las células esplénicas y las células SP2/0 se conseguía exponiendo el aglomerado a un 40 % de PEG (P.M. 1450, American Type Culture Collection, Manassas, VA) en Medio Modificado de Dulbecco de Iscoe libre de suero (IMDM) durante dos minutos. El PEG y la suspensión celular se diluyeron lentamente añadiendo 20 ml de IMDM libre de suero durante un periodo de cinco minutos, seguido por la recolección de las células por centrifugación. El sobrenadante se decantó y se sustituyó con 30 ml de IMDM que contenía un 20 % de suero fetal bovino (Hyclone, Logan, Utah) con HAT (hipoxantina, aminopterina, y timidina) para seleccionar los hibridomas. También se añadieron células esplénicas de un ratón BALB/c no inmunizado como una capa de alimentación. Las células se colocaron en placas a 0,1 ml/pocillo en tres placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Tres días más tarde se añadieron 0,1 ml adicionales de medio HAT a cada pocillo. A intervalos semanales a partir de entonces, se sustituyó la mitad del medio con IMDM que contenía un 20 % de suero fetal bovino con HAT, y se dejó que crecieran los híbridos unos 7-14 días adicionales.

Algunos de los híbridos estaban compuestos por células esplénicas, que producían anticuerpos contra VIH-1, fusionadas con células SP2/0. En resumen, el fusógeno promueve la fusión de las membranas de las células esplénicas y SP2/0, formando un heterocarion que contiene los núcleos de ambas células. Eventualmente, los núcleos no similares se fusionan produciendo un único núcleo capaz de mitosis sincrónica. Según se dividen las células fusionadas, el híbrido se estabiliza perdiendo cromosomas de cada núcleo. Las células fusionadas se colocaron en placas en múltiples placas de 96 pocillos a  $10^5$  to  $10^6$  células por pocillo. Las células híbridas formadas a partir de las fusiones de SP2/0:células esplénicas se propagaron selectivamente cultivándolas en medio HAT. Se evitó el crecimiento de las células SP2/0 no fusionadas o las células SP2/0:SP2/0 fusionadas, con aminopterina, y las células esplénicas no fusionadas o las células esplénicas:esplénicas fusionadas morían en el cultivo. Solamente crecerán los híbridos de células esplénicas:SP2/0 en el medio de selección HAT.

#### Ejemplo 5

##### Exploración, clonación y caracterización de anticuerpos monoclonales contra p24

Tras 10-14 días, los fluidos del cultivo de los pocillos que contenían el cultivo de células de hibridoma se exploraron en cuanto al anticuerpo contra p24 de VIH-1. Se utilizó un EIA indirecto para explorar los fluidos del cultivo de las fusiones celulares nº 103, nº 108, nº 115B, y nº 117. Con el fin de seleccionar los anticuerpos monoclonales anti-proteínas nucleares de VIH con alta afinidad, se utilizó también un ensayo EIA sándwich directo para explorar clones potencialmente útiles de las fusiones celulares nº 120A y la clonación de las fusiones nº 115B y 120A. Tanto los EIA directo o indirecto se describen en la sección de evaluación del título antiseros del Ejemplo 2. Los datos primarios de la exploración de los hibridomas descritos en la presente solicitud se muestran en la Tabla 2a y 2b.

Tabla 2a. Fusión primaria explorada por EIA de unión indirecta

| Lectura a A490 nm |                     |         |                |
|-------------------|---------------------|---------|----------------|
| Híbrido nº        | Ag de VIH utilizado | Muestra | Control blanco |
| 103-350           | lisado de p24-M     | 0,921   | 0,030          |
| 108-394           | lisado de p24-M     | 0,497   | 0,000          |
| 115B-151          | lisado de p24-M     | 0,662   | 0,012          |
| 115B-303          | lisado de p24-M     | 0,467   | 0,003          |
| 117-289           | lisado de p24-M     | 0,295   | 0,000          |

Tabla 2b. Fusión primaria explorada por EIA sándwich directo

| Lectura a A490 nm |                     |         |                  |
|-------------------|---------------------|---------|------------------|
| Híbrido nº        | Ag de VIH utilizado | Muestra | Control negativo |
| 120A-270          | lisado de p24-M     | 0.501   | -0.011           |

Los hibridomas que presentaban una señal positiva fuerte en los EIA de exploración primaria se transfirieron a placas de 24 pocillos para la expansión celular. Los fluidos del cultivo se ensayaron de nuevo en cuanto a la presencia de anticuerpo anti-p24. Los híbridos anti-p24 positivos se expandieron adicionalmente en matraces T25 por clonación por dilución limitante. Cada híbrido expandido se colocó en una placa de 96 pocillos a una dilución de  $10^5$  to  $10^6$  y se dejó en cultivo durante 10-21 días. Los fluidos del cultivo de la dilución limitante se ensayaron en cuanto a la presencia de anticuerpo anti-p24. La denominación del hibridoma se basa en un sistema de numeración que utiliza 3 números: siendo el primero el número de fusión, el segundo es el número del híbrido parental y el tercero es el número de subclón. Cada placa de cultivo tisular de 96 pocillos se numeró secuencialmente del 1 al 96. Por ejemplo, el hibridoma nº 103-350-474 se origina de la fusión 103ª. El híbrido parental es el nº 350 ya que se deriva de la 3ª placa de fusión en el pocillo nº 50. El subclón es el nº 474 ya que es de la 4ª placa de clonación, pocillo nº 74. Los clones se obtuvieron por dilución limitada utilizando las directrices perfiladas por J. W. Goding in Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Academic Press, N.Y., 1983). Los datos de clonación primaria para los hibridomas descritos en la presente solicitud se muestran en la Tabla 3a y 3b.

Tabla 3a. Clon primario explorado por EIA de unión indirecta

| Lectura a A490 nm |                     |         |                |
|-------------------|---------------------|---------|----------------|
| Clon nº           | Ag de VIH utilizado | Muestra | Control blanco |
| 103-350-474       | lisado de p24-M     | 0,489   | 0,021          |
| 108-394-470       | lisado de p24-M     | 0,466   | 0,000          |

Tabla 3b. Clon primario explorado por EIA sándwich directo

| Lectura a A490 nm |                     |         |                |
|-------------------|---------------------|---------|----------------|
| Clon nº           | Ag de VIH utilizado | Muestra | Control blanco |
| 115B-151-423      | lisado de p24-M     | 0,846   | 0,000          |
| 115B-303-620      | lisado de p24-M     | 0,991   | 0,006          |
| 117-289-555       | lisado de p24-M     | 0,830   | 0,011          |
| 120A-270-108      | lisado de p24-M     | 0,371   | -0,021         |

Los isotipos de los Mab anti-p24 se determinaron con el sistema de clonotipado SBA (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL). En resumen, se revistieron los pocillos de una placa de microtitulación con porciones de 100 ul de anticuerpos de cabra anti-IgG+M de ratón (KPL) durante 18-24 horas a 2-8 °C. Los pocillos se lavaron y bloquearon con un 2 % de BSA en PBS durante 30 minutos a TA. Tras el lavado, se añadieron porciones de 100 ul de los fluidos de cultivo a los pocillos y se incubaron durante 2 horas a TA en un agitador de placas. Tras el lavado, se añadieron porciones de 100 ul de anticuerpos de conejo anti-ratón específicos del isotipo a los pocillos y se incubaron durante una hora a TA en un agitador de placas. Después del lavado, se añadieron 100 ul de conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-HRPO (KPL) a los pocillos y se incubaron durante otros 30 minutos a TA en un agitador de placas. Después del lavado final, se añadió el cromógeno OPD como se ha descrito anteriormente. Los isotopos de los Mab 103-350-474, 108-394-470, 115B-151-423 (de acuerdo con la invención), 115B-303-620, 117-289-555, y 120A-270-108 se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Isotipos de anticuerpos monoclonales

| ID de Mab    | Isotipo | Cadena ligera |
|--------------|---------|---------------|
| 103-350-474  | IgG2a   | kappa         |
| 108-394-470  | IgG2b   | kappa         |
| 115B-151-423 | IgG1    | kappa         |
| 115B-303-620 | IgG2b   | kappa         |
| 117-289-555  | IgG1    | kappa         |
| 120A-270-108 | IgG1    | kappa         |

Las reactividades específicas de los Mab contra los antígenos de VIH-1/2 se ensayaron en el EIA sándwich directo como se ha descrito en la sección previa. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Reactividades de Mab anti-p24 de VIH-1 con p24/p26 de VIH-1/2

| ID de Mab       | Reactividad con |                 |                 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                 | p24-M           | Lisado de p24-O | Lisado de VIH-2 |
| 103-350-474     | ++              | ++              | ++              |
| 108-394-470     | ++              | ++              | +               |
| 115B-151-423    | ++              | ++              | ++              |
| 115B-303-620    | ++              | ++              | ++              |
| 117-289-555     | ++              | ++              | ++              |
| 120A-270-108    | ++              | ++              | ++              |
| ++ = Muy fuerte |                 |                 |                 |

En vista de los resultados presentados en la Tabla 5, todos los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación reaccionan con los antígenos p24/p26 de VIH-1/2 (lisados víricos del grupo O de VIH-1 y NIH-Z de VIH-2 se adquirieron en ABI (Gaithersburg, MD)).

### Ejemplo 6

#### Producción y purificación de anticuerpos

Con el fin de producir grandes cantidades de Mab para la caracterización y ensayo posterior, se expandieron las líneas celulares de hibridoma anti-p24 en matraces T250 y se acostumbraron gradualmente al medio libre de suero, H-SFM (Life Technologies, Grand Island, NY). Cuando las líneas celulares de hibridoma se adaptaron a H-SFM, se sembraron en botellas rotatorias para la producción de anticuerpos a gran escala. Los fluidos del cultivo se recolectaron de las botellas rotatorias y se concentraron por un sistema de filtración. El anticuerpo derivado de las botellas rotatorias se purificó en una columna de Proteína A de PerSeptive Biosystems (Cambridge, MA).

### Ejemplo 7

#### Medición de la afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-p24

Se midieron las afinidades de los Mab anti-p24 103-350-474, 108-294-470, 115B-303-620, 115B-151-423 (de acuerdo con la invención), 117-289-555, y 120A-270-108 con un instrumento inmunosensor BIAcore basado en una resonancia de plasma superficial (SPR) (Pharmacia, Uppsala, Suecia). En resumen, se acoplaron covalentemente anticuerpos de cabra anti-IgG (Fc) de ratón a chips amino-sensores por química EDAC. Cada anticuerpo monoclonal IgG de ratón se inyectó en el chip del sensor y era capturado por los anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón. El anticuerpo monoclonal de ratón no unido se lavó retirándolo del chip. Se registró una medición de línea basal de señal de resonancia de plasma superficial (SPR) para cada monoclonal. Cuando la proteína p24 de VIH-1 se inyectaba en el chip del sensor y se dejaba reaccionar con un anticuerpo monoclonal anti-p24, la señal de SPR comenzaba a aumentar. La pendiente de la curva de unión era proporcional a la constante de asociación de cada anticuerpo monoclonal. Después de conseguir la unión, se introdujo una etapa de lavado. La tasa de disociación de la p24 del anticuerpo monoclonal anti-p24 era proporcional a la disminución de la señal SPR. Tras cada ciclo de medición, se aplicó un tampón de HCl en el chip del sensor para retirar el anticuerpo monoclonal anti-p24 del chip del sensor para la siguiente medición. Basándose en la velocidad de asociación y la velocidad de disociación de las señales SPR, se determinaron las constantes de asociación ( $K_a$ ), disociación ( $K_d$ ), y de afinidad relativa ( $K$ ) de cada anticuerpo monoclonal. Los datos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Constantes de unión

| Clon nº      | $K_a(M^{-1}s^{-1})$ | $K_d(s^{-1})$        | $K(M^{-1})$       |
|--------------|---------------------|----------------------|-------------------|
| 103-350-474  | $8,3 \times 10^5$   | $5,1 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^9$ |
| 108-394-470  | $8,1 \times 10^5$   | $4,2 \times 10^{-4}$ | $1,9 \times 10^9$ |
| 115B-151-423 | $1,3 \times 10^6$   | $2,0 \times 10^{-4}$ | $6,5 \times 10^9$ |
| 115B-303-620 | $8,3 \times 10^5$   | $2,6 \times 10^{-4}$ | $3,2 \times 10^9$ |
| 117-289-555  | $3,5 \times 10^5$   | $3,3 \times 10^{-4}$ | $1,1 \times 10^9$ |
| 120A-270-108 | $8,1 \times 10^5$   | $8,8 \times 10^{-4}$ | $9,2 \times 10^9$ |

## Ejemplo 8

Maapeo de epítomos de anticuerpos monoclonales

5 Los epítomos en la p24 de VIH-1 reconocidos por los anticuerpos monoclonales de ratón, se identificaron utilizando dos grupos de trece péptidos sintéticos de p24 (Figura 1a). El diseño del péptido se basó en la estructura tridimensional del antígeno p24 (Gitti, et al., Science 273: 231 (1996); Gamble, et al., Science 278: 849 (1997)) con el fin de presentar regiones seleccionadas ininterrumpidas de estructura helicoidal (*in vivo*) que pueden ser únicas o epítomos compartidos. Estos péptidos cubrían todas las regiones helicoidales (A-J) de las proteínas nucleares. Los anticuerpos monoclonales se hicieron reaccionar contra los péptidos del grupo M (clado B) y Grupo O (Ham112). Los péptidos se denominaron M1 a M13 que representaban la p24 del grupo M de VIH-1 clado B, o O1 a O13 que representaban la p24 del grupo O de VIH-1 (aislado Ham 112). Cada péptido también contenía una cisteína adicional en su extremo C que reaccionaba con hemocianina de lapa californiana modificada con maleimida (KLH) para formar dos series de péptidos conjugados con KLH además de péptidos no conjugados. Los péptidos conjugados con KLH se generaron con el fin de ayudar a estabilizar y presentar las estructuras conformacionales que pueden ser esenciales para la presentación y reconocimiento del epítomo (unión al monoclonal). Los péptidos conjugados con KLH se denominaron KM1 a KM13 para los péptidos del grupo M o KO1 a KO13 para péptidos del grupo O.

20 La unión de los anticuerpos monoclonales (Mab) a grupos de péptidos sintéticos se determinó por un ensayo ELISA indirecto. En resumen, se revistieron los pocillos de placas de microtitulación con los péptidos sintéticos conjugados con KLH o libres. Los pocillos revestidos con el péptido se incubaron con los Mab preparados a una concentración de aproximadamente 1 ug/ml. Los Mab unidos se detectaron con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón, marcados con una enzima o acridinio. Los datos representativos se representan en las Figuras 2a y b.

25 Los epítomos reconocidos por los Mab 103-350-474, 117-289-555, 115B-303-620 (de acuerdo con la invención) y 120A-270-108 se identificaron de la siguiente manera:

30 El anticuerpo monoclonal 103-350-474 unido específicamente a los péptidos nº 4 del grupo M y el grupo O de VIH-1 (KM4/KO4), que se corresponden a la región de la hélice D de p24. El epítomo es lineal con necesidades conformacionales secundarias evidentes. Se detectó poca o ninguna unión cuando se hacía reaccionar el 103-350-474 contra péptidos libres (no conjugados). Por el contrario, cuando los péptidos se conjugaban con un vehículo proteico (KLH) con el fin de promover las estructuras peptídicas conformacionales secundarias, 103-350-474 presenta consistentemente una unión fuerte (S/N alta) contra los péptidos KM4/OM4). El epítomo parece ser lineal debido a que el anticuerpo se une a pequeños péptidos sintéticos, pero el epítomo óptimo puede necesitar estructuras helicoidales secundarias específicas. Por lo tanto, el epítomo se define más ampliamente como que comprende los aminoácidos 63-89, y se estima más estrechamente como que necesita los aminoácidos 63-80, que mapean la región de la hélice D. Además, la reactividad cruzada del anticuerpo entre p24 de M y O indica que las regiones de p24 de mayor homología de secuencia en la hélice D están implicadas muy probablemente en la formación del epítomo. Los restos en negrita son muy probablemente claves para formar el epítomo, pero no se puede excluir la estructura secundaria que implica o que necesita los aminoácidos vecinos.

Péptido (K)M4 63-89:

45 CQAAMQ MLKET INEEA AEWDR VHPVH AG (SEQ ID NO: 1)

Péptido (K)O4 63-89:

50 CQGALQ VLKEV INEEA ADWDR SHPPV VG (SEQ ID NO: 2)

55 El anticuerpo monoclonal 117-289-555 se une específicamente tanto a los péptidos M10/O10 del grupo M y el grupo O, que se corresponden con la región de hélice H, que es parte de la región de homología principal (MHR). El epítomo parece ser lineal debido a que el anticuerpo se une fácilmente a los péptidos M10/O10 libres (no conjugados). Se espera la unión a p24 tanto del grupo M como del grupo O. Los restos en negrita probablemente son claves para formar el epítomo.

Péptido M10 151-176:

60 CLDIRQ GPKEP FRDYV DRFYK TLRAEQ (SEQ ID NO: 3)

Péptido O10 152-177:

65 CLDIKQ GPKEP PRDYV DRFYK TLRAEQ (SEQ ID NO: 4)

El anticuerpo monoclonal 115B-303-620 (de acuerdo con la invención) se une a los péptidos M12 y O12, que se corresponde con la región de la hélice J-K de p24. El epítomo parece que es lineal basándose en la fuerte unión (S/N

alta) a los péptidos libres (no conjugados) M12/O12. Los restos en **negrita** probablemente son claves en la formación del epítipo, pero no se puede excluir la estructura secundaria que implique o necesite aminoácidos vecinos.

Péptido M12:

5

CKTIL KALGP AATLE EMMTA (SEQ ID NO: 5)

Péptido O12:

10

CKQIL KALGP GATLE EMMVA (SEQ ID NO: 6)

15

El anticuerpo monoclonal 120A-270-108 mapeado en la hélice H y la región MHR de p24 al igual que el anticuerpo monoclonal 117-289-555. Sin embargo, el 120A-270-108 reconoce un epítipo distinto de un epítipo reconocido por 117-289-555. La diferencia significativa entre 117-289-555 y 120A-270-108 es que 120A-270-108 solo se une moderadamente al péptido M10 conjugado con KLH. No se detectaba unión cuando se hacía reaccionar el 120A-270-108 con péptidos libres (no conjugados). Por lo tanto el epítipo óptimo de 120A-270-108 necesita estructuras secundarias o terciarias específicas. Además, 117-289-555 y 120A-270-108 pertenecen a diferentes grupos de compatibilidad debido a que se unen simultáneamente a proteínas nucleares sin interferencia o competición entre ellos (véase la Tabla 7 posterior).

20

Tabla 7. Formación de sándwich de mAb con proteínas p24 (tanto del grupo M como del grupo O)

| mAb en fase sólida                                                                                | Señal de mAb marcados en la fase en solución |             |              |              |             |              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
|                                                                                                   | 103-350-474                                  | 117-289-555 | 115B-303-620 | 115B-151-423 | 108-394-470 | 120A-270-108 |
| 103-350-474                                                                                       | -                                            | +           | +            | +            | -           | -            |
| 117-289-555                                                                                       | +                                            | -           | +            | +            | +           | +            |
| 115B-303-620                                                                                      | +                                            | +           | -            | +            | +           | +            |
| 115B-151-423                                                                                      | +                                            | +           | +            | -            | +           | +            |
| 108-394-470                                                                                       | -                                            | +           | +            | +            | -           | -            |
| 120A-270-108                                                                                      | -                                            | +           | +            | +            | -           | -            |
| 120B-580-106 hélice A                                                                             | +                                            | +           | +            | -            | +/-         | +/-          |
| El signo + indica compatibilidad de los mAb emparejados al unirse al antígeno p24 simultáneamente |                                              |             |              |              |             |              |

El estudio de compatibilidad también demostraba que, a diferencia del 117-289 que se puede emparejar con Mab 103-350 o 108-394 para formar un sándwich, 120A-270 no puede formar un sándwich con ningún Mab (Tabla 7). Los datos de compatibilidad demuestran claramente que el epítipo que reconoce el 120A-270 es distinto y diferente del epítipo reconocido por 117-289. El Mab 120-270 más probablemente reconoce un epítipo conformacional, formado en parte, por los aminoácidos 151-176.

Dos Mab 115B-151 (de acuerdo con la invención) y 108-394, no se unen a péptidos sintéticos libres, y el 115B-151 (de acuerdo con la invención) se une débilmente a un péptido acoplado a KLH (Figura 2B). La falta de unión a péptidos sintéticos indica que estos Mab reconocen los epítipos conformacionales en el núcleo antigénico. Los epítipos conformacionales están formados por aminoácidos contiguos que se juntan por el plegamiento terciario o cuaternario del antígeno p24. Un epítipo conformacional que depende de la estructura terciaria y cuaternaria en general no puede imitarse por pequeños péptidos sintéticos.

Se utilizó un grupo de polipéptidos p24 con gran solapamiento para localizar los epítipos conformacionales reconocidos por 115B-151 (de acuerdo con la invención) y 108-394. Los polipéptidos de p24 solapados se expresaron en *E. coli* (proteínas r) a partir de plásmidos que albergaban porciones únicas de la secuencia de nucleótidos de p24 (clones de eliminación). Dos grupos de seis clones de eliminación se diseñaron basándose en la estructura de p24. Se determinó la unión específica de los anticuerpos monoclonales a los polipéptidos p24 utilizando el método de transferencia de Western. En resumen, los polipéptidos p24 (recombinantes) expresados en extractos de *E. coli* se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de celulosa. Las membranas que contenían las proteínas separadas electroforéticamente se hicieron reaccionar con loa Mab contra p24 (a una concentración de ~ 5 ug/ml) y los anticuerpos monoclonales unidos se detectaban con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado enzimáticamente. La Figura 4 ilustra los resultados de la transferencia de Western de los Mab 115B-151 (de acuerdo con la invención) y 108-394.

El anticuerpo monoclonal 115B-151 (de acuerdo con la invención) que se une específicamente a los polipéptidos del grupo M F(1-172) y G(137-231) y polipéptidos del grupo O N(1-173) y O(138-232). La región solapada (aminoácidos 137-172) entre F y G y N y O, puede contribuir al epítipo reconocido por 115B-151 (de acuerdo con la invención). Estos datos están apoyados por la unión débil pero constante de 115B-151 (de acuerdo con la invención) contra los péptidos sintéticos conjugados con KLH KM10 y KO10, que contienen los aminoácidos 137-172 (Figura 2B). El Mab 115B-151 (de acuerdo con la invención) se diferenciaba de 117-289 y 120A-270 debido a que (a) 115B-151 (de acuerdo con la invención) aparentemente necesitaba que el epítipo estuviera en una conformación secundaria o terciaria específica, (b) era compatible con 117-289/120A-270 para formar un sándwich con p24 (Tabla 7), y (c) los anticuerpos monoclonales contra la hélice A eran incompatibles y competían fuertemente con 115B-151 (de acuerdo con la invención), pero eran compatibles con 117-289. La fuerte competición del monoclonal dirigido contra la hélice A con 115B-151 (de acuerdo con la invención), además de la débil unión contra péptidos conjugados con KLH, puede indicar que el epítipo óptimo reconocido por 115B-151 (de acuerdo con la invención) incluye una parte de la hélice A además del epítipo lineal mínimo identificado en la hélice H.

El monoclonal 108-394 mapeaba un epítipo conformacional con los primeros 172/173 aminoácidos de p24 M/O. El epítipo es no lineal debido que los péptidos sintéticos M y O de VIH-1, libres o conjugados con el vehículo proteico KLH, no reaccionaban con 108-394. Además, el 108-394 reaccionaba solo con los polipéptidos más grandes (F 1-172/ N 1-173) derivados de p24 M/O. Aunque los polipéptidos M C (1-65), E<sub>-</sub> (1-130), e I (60-150), y los polipéptidos L (1-65), M (1-131), y Q (60-151) contienen grandes segmentos de la misma secuencia que se encuentra en los polipéptidos F (1-172) y N (1-173), un epítipo reconocido por 108-394 aparentemente no estaba formado por los polipéptidos más cortos. Estos datos son consistentes con un epítipo conformacional formado por una porción principal de p24 al menos los primeros 172/173 aminoácidos.

Basándose en los datos del mapeo de epítipos utilizando péptidos sintéticos y clones de eliminación de p24 y los datos del estudio de compatibilidad de sándwich, se ilustra un mapa de epítipo de los seis mAb en la estructura tridimensional del antígeno p24 en la Figura 5. La estructura de la molécula de p24 está representada por dos dominios, el dominio del extremo N (aminoácidos 1-151), y el dominio del extremo C (aminoácidos 151-231). La estructura de la molécula p24 intacta no se ha determinado por lo que la relación estructural entre los dos dominios no está totalmente caracterizada.

Los seis mAb mapeaban el antígeno p24 de la siguiente manera (Figura 5):

El anticuerpo monoclonal 103-350-474 se une a un epítipo lineal localizado en la región de la hélice D de p24 M y O de VIH-1. El epítipo se define más ampliamente como que comprende los aminoácidos 63-89, y se estima más ajustadamente como que comprende los aminoácidos 63-80 del antígeno p24 del grupo M y el grupo O.

El anticuerpo monoclonal 117-289-555 se une a un epítipo lineal localizado en la región MHR/región de hélice H de p24. El epítipo se define más ampliamente como que comprende los aminoácidos 151-172 (M)/152-173 (O), y se define más ajustadamente como los aminoácidos 162-172 (M)/163-173 (O) del antígeno p24.

El anticuerpo monoclonal 115B-303-620 se une a una epítipo lineal localizado en las regiones helicoidales J-K del antígeno p24. El epítipo se define como los aminoácidos 198-217 (M)/199-218 (O) del antígeno p24.

El anticuerpo monoclonal 115B-151-423 (de acuerdo con la invención) se une a un epítipo conformacional que está muy probablemente en la parte de unión de la hélice A y las regiones MHR/hélice H de p24.

El anticuerpo monoclonal 108-394-470 se une a un epítipo conformacional en el dominio del extremo N (aminoácidos 1-151) de p24. El epítipo conformacional se estima que está cerca de la parte de unión de la hélice D y la hélice A.

El anticuerpo monoclonal 120A-270-108 se une a un epítipo conformacional que se estima que está cerca de la parte de unión de la hélice D, hélice A y regiones MHR/hélice H de p24.

### Ejemplo 9

#### Preparación de micropartículas revestidas de anticuerpo monoclonal

Se activaron micropartículas de látex modificado con carboxilo (CML) sólidas al 1 % (obtenidas en Bangs Laboratories, Fishers, IN) con carbodiimida EDC [hidrocloruro de (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida de Sigma Chemicals, St. Louis, MO] a una relación molar de EDC: grupos carboxilo = 10:1 en 50 mM de tampón MES [ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico] pH 6,1 durante 5 minutos a TA en un rotador fin sobre fin (Roto-Torque, Cole Parmer Instruments, Vernon Hills, IL) ajustado alto en la escala 5. Los Mab anti-núcleo se añadieron a las partículas CML pre-activadas con EDC a una relación de 200 ug de anticuerpo/por ml de micropartículas sólidas al 1 % durante 4 horas a temperatura ambiente en un rotador fin sobre fin. Los reactivos libres se lavaron utilizando un sistema de diafiltración Abbott (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) con una membrana de jeringa de flujo cruzado (tamaño de poro de 0,2  $\mu$ m y una superficie de 12 cm<sup>2</sup>, obtenida en Spectrum, Laguna Hills, CA). Las micropartículas revestidas de Mab se revistieron con tampón que contenía 10 mM de PBS y un 5 % de BSA, un 0,03 % de azida sódica durante 1 hora a TA en un rotador. Las micropartículas CML se tensionaron por calor en una incubadora horno a 45 °C durante 20 horas y luego se ensayaron con el instrumento Abbott Prism Standalone (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

### Ejemplo 10

#### Preparación de conjugados de anticuerpo marcado con acridinio

Los Mab anti-núcleo de VIH, pH 7,4 se hizo reaccionar con éster activo de N-hidroxisuccinimida-acridinio (ACR-NHS) con la relación molar de Mab:ACR-NHS = 1:15 durante 10 minutos a TA en un rotador fin sobre fin (Cole Parmer Instruments, Vernon Hills, IL). El conjugado Mab-marcado con ACR se separó de los reactivos libres en una columna Sephadex G-25 (15 cm x 1,5 cm) que se pre-equilibró en PBS pH 6,3 que contenía un 1 % de CHAPS. El pico de elución de Mab marcado con ACR se controló a la siguiente absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-2101PC). La concentración de proteína mAb marcado con ACR =  $(DO_{280\text{ nm}} - 0,247 \times DO_{370\text{ nm}}) / 1,38$ . Las relaciones molares de ACR / mAb =  $(DO_{280\text{ nm}} - 0,247 \times DO_{370\text{ nm}}) \times 15$ .

### Ejemplo 11

#### Métodos y preparación del inmunoensayo prisma

Las micropartículas-mAb anti-p24 (reserva concentrada) se diluyeron en diluyente de micropartículas (10 mM de PBS, pH 6,5 que contenía un 5 % de suero bovino, un 7,5 % de sacarosa, 50 mM de EDTA, un 0,1 % de Tween 20, y un 0,1 % de proclín). Los conjugados mAb anti-p24-ACR se diluyeron en diluyente de conjugado (10 mM de PBS, pH 6,3 que contenía 40 mM de EDTA, un 5 % de suero bovino, un 0,5 % de Triton, y un 0,1 % de proclín). Se utilizaron dos tampones de lavado en el ensayo. El tampón de lavado de transferencia contenía 25 mM de MES pH 5,7, 150 mM de NaCl, un 4 % de Triton X-100, un 1 % de Tween 20, un 0,001 % de PEG, un 0,1 % de proclín, y un 0,001 % de antiespumante. El tampón de lavado de conjugado contenía 10 mM de CAPS, pH 9,9, 150 mm de NaCl, un 5 % de Triton X-100, un 0,1 % de proclín, y un 0,001 % de antiespumante. El lisado vírico de p24-M de VIH-1, rp24-O, rp26 de VIH-2, y VIH-2 se diluyeron en plasma humano negativo a VIH-1/2. El plasma humano normal se utilizó también como un control negativo.

#### Procedimiento del ensayo

En resumen, todos los reactivos se atemperaron a temperatura ambiente antes de imprimación del instrumento. El tampón de lavado de transferencia, tampón de lavado de conjugado, conjugado mAb anti-p24-ACR, y el activador se conectaron a una línea de reactivo apropiado. Los reactivos se imprimaron dos veces y las burbujas de aire atrapadas en las líneas de reactivo se destruyeron. Se añadieron cien  $\mu$ l de muestras y 50  $\mu$ l de diluyente de espécimen (25 mM de PBS pH 6,5, un 1 % de Triton X-100, un 0,4 % de Tween 20, 20 mM de EDTA, y un 0,1 % de proclín) en los pocillos de reacción A y B de la placa de muestras manualmente. Las placas se cargaron en el

instrumento y se movió constantemente a lo largo del canal durante las etapas de ensayo. Cuando la placa de muestras se movía en la estación de micropartículas se añadían 50 µl de micropartículas revestidas de mAb anti-p24 en cada pocillo de reacción. El resto de las etapas de ensayo se llevaban a cabo automáticamente por el instrumento. La temperatura del canal del instrumento se mantuvo a 37 °C. Tras 18 minutos de incubación a 37 °C, la placa de muestra se trasladó a la estación de lavado de transferencia. La mezcla de muestra y micropartículas se descargaron en una matriz de fibra de vidrio por tampón de transferencia y se lavaron 2 veces con el tampón de transferencia. Se añadieron cincuenta µl de conjugado mAb anti-p24-ACR se añadieron en la matriz de fibra de vidrio. Tras 20 minutos de incubación, la placa de muestras se trasladó a la estación de lavado de conjugado. Los conjugados no unidos se lavaron con tampón de lavado conjugado. Tras el lavado de conjugado, la placa de muestra se trasladó a la estación de activador. Se aplicaron cincuenta µl de activador (mezcla de peróxido de hidrógeno e hidróxido sódico) a la matriz. La señal de luz quimioluminiscente se leyó en un detector fotomultiplicador de tubos.

## Ejemplo 12

### Detección equivalente de proteínas nucleares de VIH (antígenos) utilizando dos anticuerpos monoclonales

La sensibilidad equivalente cuantitativa contra el antígeno nuclear que utiliza parejas compatibles de monoclonales de alta afinidad se demostró en un inmunoensayo "sándwich" quimioluminiscente en dos etapas ejecutado en un instrumento Abbott Prism standalone (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Combinando micropartículas revestidas con 120A-270-108 (al 0,066 % sólidas) con conjugado 115B-151-423-ACR a 60 ng/ml, se conseguía una detección equivalente de proteínas nucleares del grupo M de VIH-1, grupo O de VIH-1, y VIH-2. Los límites inferiores de detección para la p24 del grupo M de VIH-1 se estimó en 0,3 pg/ml (Figura 6), 0,3 pg/ml para la rp24 del grupo O de VIH-1 (Figura 7), y 1,0 pg/ml para la rp26 de VIH-2 (Figura 8). Solamente se detectaron pequeñas diferencias (de 3,3 veces) en la sensibilidad cuantitativa entre VIH-1 y VIH-2. La sensibilidad equivalente a lo largo de los tres antígenos nucleares relacionados, pero no idénticos, sostiene fuertemente que por la Keq inusualmente alta, estos anticuerpos monoclonales se dirigen contra epítomos compartidos, no contra epítomos de reacción cruzada. La afinidad de estos Mab contra los antígenos nucleares (M, O de VIH-1 y VIH-2) debe ser casi igual debido a la cinética de unión casi equivalente contra los tres antígenos nucleares. En general, la Keq disminuye cuando los Mab se hacen reaccionar contra epítomos de reacción cruzada, que se indica por la sensibilidad cuantitativa marcadamente baja con los antígenos de reacción cruzada en comparación con el antígeno (inmunógeno) nativo. Además, las pequeñas diferencias en la cuantificación de las proteínas de VIH-1 y VIH-2 a las que se hace referencia en el presente documento pueden relacionarse más con los métodos (errores en los métodos) y las proteínas a cuantificar utilizadas en los estudios.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott Laboratories  
Lou, Sheng C.  
Hunt, Jeffrey C.  
Konrath, John G.  
Qiu, Xiaoxing  
Scheffel, James W.  
Tyner, Joan D.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 6755.US.01

<140> 09/731.126  
<141> 06-12-2000

<160> 9

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 1

# ES 2 619 370 T3

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

<210> 2  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana  
 <400> 2

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

<210> 3  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana  
 <400> 3

Cys Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln

20 25

<210> 4  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana  
 <400> 4

Cys Leu Asp Ile Lys Gln Gly Pro Lys Glu Pro Pro Arg Asp Tyr Val  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln  
 20 25

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana  
 <400> 5

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

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana  
 <400> 6

# ES 2 619 370 T3

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

<210> 7  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 7

Pro Val Val Pro Asn Ala Gln Gly Gln Met Ile His Gln Ala Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Ala Val Glu Glu Lys Ala Phe  
 20 25 30  
 Asn Pro Glu Ile Ile Pro Met Phe Met Ala Leu Ser Glu Gly Ala Ile  
 35 40 45  
 Pro Tyr Asp Ile Asn Ile Met Leu Asn Ala Ile Gly Gly His Gln Gly  
 50 55 60  
 Ala Leu Gln Val Leu Lys Glu Val Ile Asn Glu Glu Ala Ala Asp Trp  
 65 70 75 80  
 Asp Arg Ser His Pro Pro Val Val Gly Pro Leu Pro Pro Gly Gln Ile  
 85 90 95

Arg Glu Pro Thr Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Gln Gln  
 100 105 110  
 Glu Gln Val His Trp Ile Thr Arg Ala Asn His Pro Val Pro Val Gly  
 115 120 125  
 Asp Ile Tyr Arg Lys Trp Ile Val Leu Gly Leu Asn Lys Met Val Lys  
 130 135 140  
 Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile Lys Gln Gly Pro Lys Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu  
 165 170 175  
 Gln Ala Ile Gln Asp Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val  
 180 185 190  
 Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Gln Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro  
 195 200 205  
 Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Val Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly  
 210 215 220  
 Pro Thr His Lys Ala Lys Leu Leu  
 225 230

<210> 8  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 8

```

Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser
 1              5              10              15
Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe
              20              25              30
Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr
              35              40              45
Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala
 50              55              60
Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp
65              70              75              80
Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met
              85              90              95
Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln
              100              105              110
Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu
              115              120              125
Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met
130              135              140
Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro
145              150              155              160
Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln
              165              170              175
Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln
              180              185              190
Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala
195              200              205
Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro
210              215              220
Gly His Lys Ala Arg Val Leu
225              230

```

<210> 9  
 <211> 229  
 <212> PRT  
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana

5

<400> 9

ES 2 619 370 T3

[illegible]

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une a un antígeno del Virus 1 de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) y un antígeno del Virus 2 de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-2), donde el anticuerpo se denomina 115B-151 y se secreta por una línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito en la ATCC PTA-2809.
2. Una línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito en la ATCC PTA-2809.
3. Un método para detectar la presencia de uno o más antígenos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2, en una muestra de ensayo sospechosa de contener uno o más de dichos antígenos, que comprende las etapas de:
  - a) poner en contacto dicha muestra de ensayo con el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno; y
  - b) detectar dichos complejos, indicando la presencia de dichos complejos, la presencia de al menos un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en un antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2, en dicha muestra de ensayo.
4. El método de la reivindicación 3, donde el anticuerpo monoclonal de la etapa (a) está marcado.
5. El método de la reivindicación 3, donde la etapa (b) comprende las etapas de:
  - i) añadir un conjugado a los complejos anticuerpo/antígeno resultantes de la etapa (a) durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que dicho conjugado se una al antígeno unido, donde dicho conjugado comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y
  - ii) detectar la presencia de antígeno, que puede estar presente en dicha muestra, detectando una señal generada por dicho compuesto generador de señal, indicando la presencia de dicha señal, la presencia de al menos un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2 en dicha muestra de ensayo.
6. El método de la reivindicación 5, donde dicho anticuerpo de la etapa (b) de dicho conjugado se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo, que se denomina 117-289 y se secreta por una línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito en la ATCC PTA- 2806, un anticuerpo que se denomina 103-350 y se secreta por la línea celular que tiene el N° de depósito en la ATCC PTA-2808, un anticuerpo que se denomina 115B-303 y se secreta por la línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito de la ATCC PTA-2810, y un anticuerpo, que se denomina 108-394 y que se secreta por una línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito de la ATCC PTA-2807.
7. El método de la reivindicación 3 que comprende las etapas de:
  - (a) poner en contacto: 1) el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 unido a un soporte sólido, 2) dicha muestra de ensayo, y 3) un reactivo indicador que comprende un anticuerpo que se une al antígeno de VIH-1 y el antígeno de VIH-2 y al cual se une un compuesto generador de señal, para formar una mezcla,
  - (b) incubar dicha muestra durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos anticuerpo/antígeno/anticuerpo; y
  - (c) detectar la presencia de una señal medible generada por dicho compuesto generador de señal, indicando la presencia de dicha señal, la presencia de uno o más antígenos en dicha muestra de ensayo de entre el grupo que consiste en el antígeno de VIH-1 y el antígeno de VIH-2.
8. El método de la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo de dicho reactivo indicador de la etapa (a) se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo que se denomina 117-289 y se secreta por una línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito en la ATCC PTA- 2806, un anticuerpo que se denomina 103-350 y se secreta por la línea celular que tiene el N° de depósito en la ATCC PTA-2808, un anticuerpo que se denomina 115B-303 y se secreta por la línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito de la ATCC PTA-2810, y un anticuerpo, que se denomina 108-394 y que se secreta por una línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito de la ATCC PTA-2807.
9. Un kit para determinar la presencia de uno o más antígenos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en el antígeno de VIH-1 y el antígeno de VIH-2 en una muestra de ensayo que comprende: (a) el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1; y (b) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable.
10. El kit de la reivindicación 9, donde dicho anticuerpo de (b) se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo, que se denomina 117-289 y se secreta por una línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito en la ATCC PTA- 2806, un anticuerpo que se denomina 103-350 y se secreta por la línea celular que tiene el N° de depósito en la ATCC PTA-2808, un anticuerpo que se denomina 115B-303 y se secreta por la línea celular de

hibridoma que tiene el N° de depósito de la ATCC PTA-2810, y un anticuerpo, que se denomina 108-394 y que se secreta por una línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito de la ATCC PTA-2807.

11. Un reactivo diagnóstico que comprende un anticuerpo monoclonal, que se denomina 115B-151 y se secreta por una línea celular de hibridoma que tiene el N° de depósito de la ATCC PTA-2809.

12. Un método para detectar 1) uno o más anticuerpos seleccionados de entre el grupo que consiste en anticuerpo contra el VIH-1 y anticuerpo contra el VIH-2, y 2) uno o más antígenos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en el antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2, en una muestra de ensayo sospechosa de contener dicho uno o más anticuerpos y uno o más de dichos antígenos, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto dicha muestra de ensayo con al menos un antígeno de VIH-1 que se une a un anticuerpo contra VIH-1, durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno de VIH-1/anticuerpo contra VIH-1;
- b) detectar dichos complejos antígeno de VIH-1/anticuerpo contra VIH-1, indicando la presencia de dichos complejos, la presencia de un anticuerpo contra VIH-1 en dicha muestra de ensayo;
- c) poner en contacto dicha muestra de ensayo con al menos un antígeno de VIH-2 que se une a un anticuerpo contra VIH-2, durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno de VIH-2/anticuerpos contra VIH-2;
- d) detectar dichos complejos antígeno de VIH-2/anticuerpo contra VIH-2, indicando la presencia de dichos complejos, la presencia de anticuerpos contra VIH-2 en dicha muestra de ensayo;
- e) poner en contacto dicha muestra de ensayo con el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno; y
- f) detectar dichos complejos, indicando la presencia de dichos complejos, la presencia de al menos un antígeno que se selecciona de entre el grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2, en dicha muestra de ensayo.

13. El método de la reivindicación 12, donde la etapa (b) comprende las etapas de:

- i) añadir un conjugado a los complejos antígeno de VIH-1/anticuerpo contra VIH-1 resultantes, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que dicho conjugado se una al anticuerpo unido, donde dicho conjugado comprende un antígeno unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y
- ii) detectar el anticuerpo contra VIH-1, que puede estar presente en dicha muestra de ensayo, detectando una señal generada por dicho compuesto generador de señal, indicando la presencia de dicha señal, la presencia de anticuerpo contra VIH-2 en dicha muestra de ensayo;

donde la etapa (d) comprende las etapas de:

- i) añadir un conjugado a los complejos antígeno de VIH-2/anticuerpo contra VIH-2 durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que dicho conjugado se una al anticuerpo unido, donde dicho conjugado comprende un antígeno unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y
- ii) detectar un anticuerpo contra VIH-2, que puede estar presente en dicha muestra de ensayo, detectando una señal generada por dicho compuesto generador de señal, indicando la presencia de dicha señal, la presencia de anticuerpo contra VIH-2 en dicha muestra de ensayo; y

donde la etapa (f) comprende las etapas de:

- i) añadir un conjugado a los complejos anticuerpo/antígeno resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que dicho conjugado se una al antígeno unido, donde dicho conjugado comprende un anticuerpo unido al compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y
- ii) detectar la presencia de antígeno, que puede estar presente en dicha muestra de ensayo, detectando una señal generada por dicho compuesto generador de señal, indicando la presencia de dicha señal, la presencia de al menos un antígeno que se selecciona de entre el grupo que consiste en el antígeno de VIH-1 y el antígeno del VIH-2 en dicha muestra.

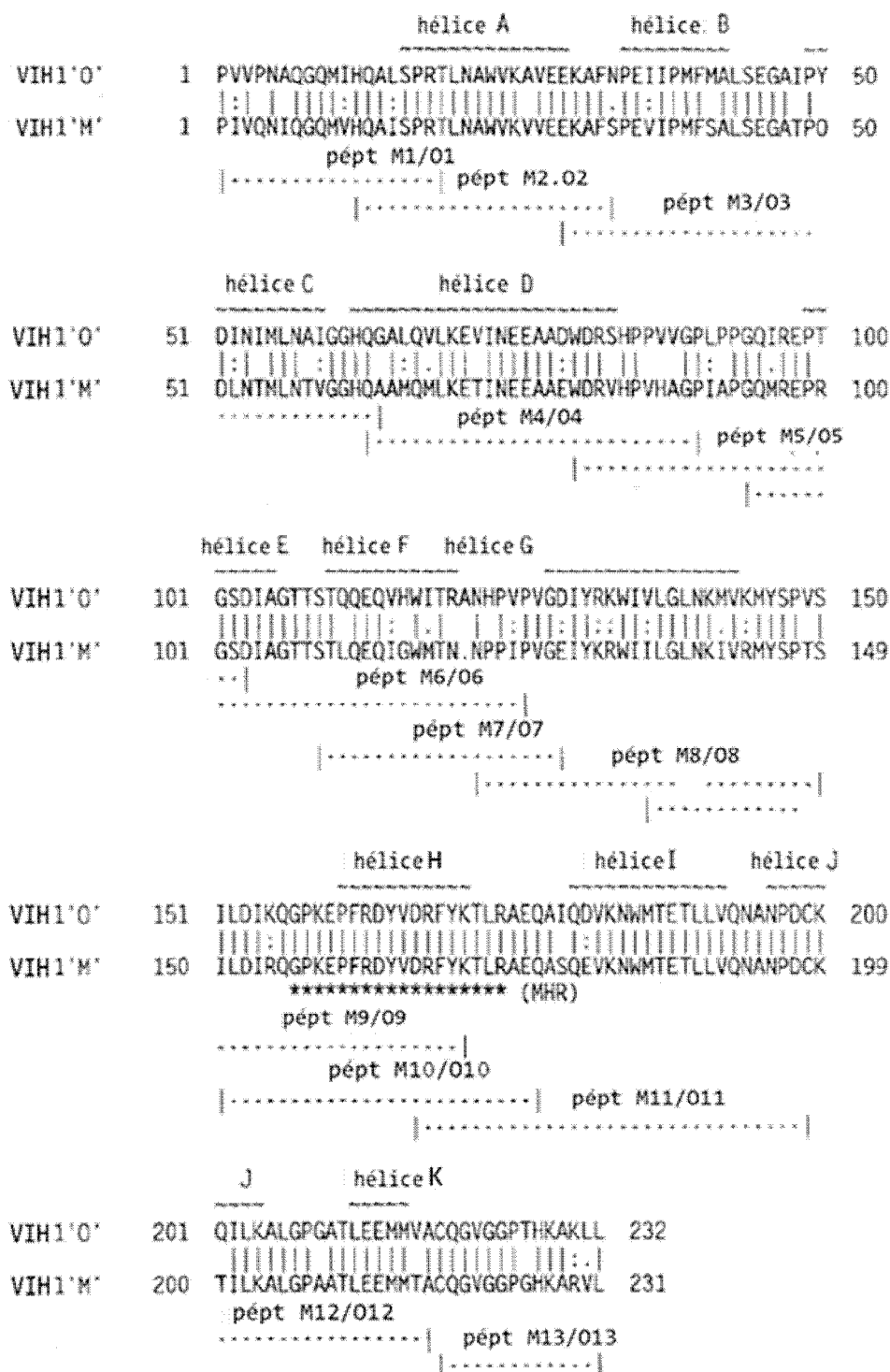


FIG. 1A

|          |     | hélice A                                             | hélice B   |         |
|----------|-----|------------------------------------------------------|------------|---------|
| VIH-1'O' | 1   | PVVPNAQQQMTHQALSPRTLNAWVKAVEEKAFNPEIIPMFALSEGAIPY    |            | 50      |
| VIH-1'M' | 1   | PIVQNIQGGQMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQ |            | 50      |
| VIH-2'A' | 1   | P.VQQAGGNYIHVPLSPRTLNAWVKLVEEKKFGAEVVPGFQALSEGCTPY   |            | 49      |
|          |     | hélice C                                             | hélice D   |         |
| VIH-1'O' | 51  | DINIMLNAIGGHQALQVLKEVINEEAADWDRSHPPVVGPLPPGQIREPT    |            | 100     |
| VIH-1'M' | 51  | DLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDVHPVHAGPIAPGQMKEPK    | pept M5/O5 | 100     |
| VIH-2'A' | 50  | DINQMLNCVGDHQAAMQIREIINEEAAADWDAQHIP.GPLPAGQLRDPR    |            | 98      |
|          |     | hélice E                                             | hélice F   | helix G |
| VIH-1'O' | 101 | GSDIAGTTSTQQEQVHWITRANHPVPVGDYRKWIVLGLNKMVKMYSPTS    |            | 150     |
| VIH-1'M' | 101 | GSDIAGTTSTLQEQIGWMTN.NPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPS    |            | 149     |
| VIH-2'A' | 99  | GSDIAGTTSTVDEQIQWYRQPNPVPVGNYYRRWIIQGLQKCVRMYNPTN    |            | 148     |
|          |     | hélice H                                             | hélice I   | helix J |
|          |     | ***** (MHR)                                          |            |         |
| VIH-1'O' | 151 | ILDIKQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQAIQDVKNWMTETLLVQNANPDCK   |            | 200     |
| VIH-1'M' | 150 | ILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCK   |            | 199     |
| VIH-2'A' | 149 | ILDVKQGPKEFQSYVDRFYKSLRAEQTDPVKNWMTQTLLIQNANPDCK     |            | 198     |
|          |     | J                                                    | hélice K   |         |
| VIH-1'O' | 201 | QILKALGPGATLEEMMVACQGVGGPTHKAKLL                     |            | 232     |
| VIH-1'M' | 200 | TILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVL                     |            | 231     |
| VIH-2'A' | 199 | LVLKGLGMNPTLEEMLTACQGVGGPSQKARLM                     |            | 230     |

FIG. 1 B

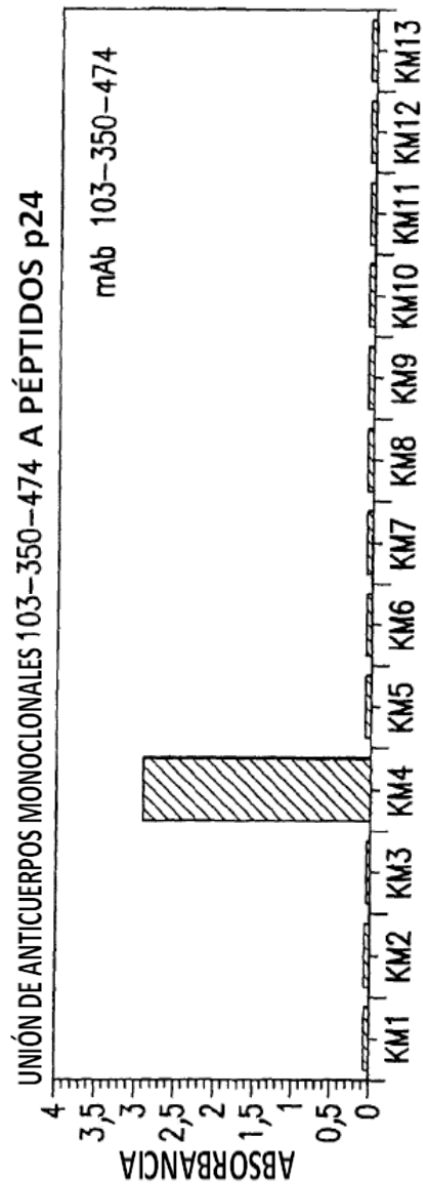


FIG.2A-1

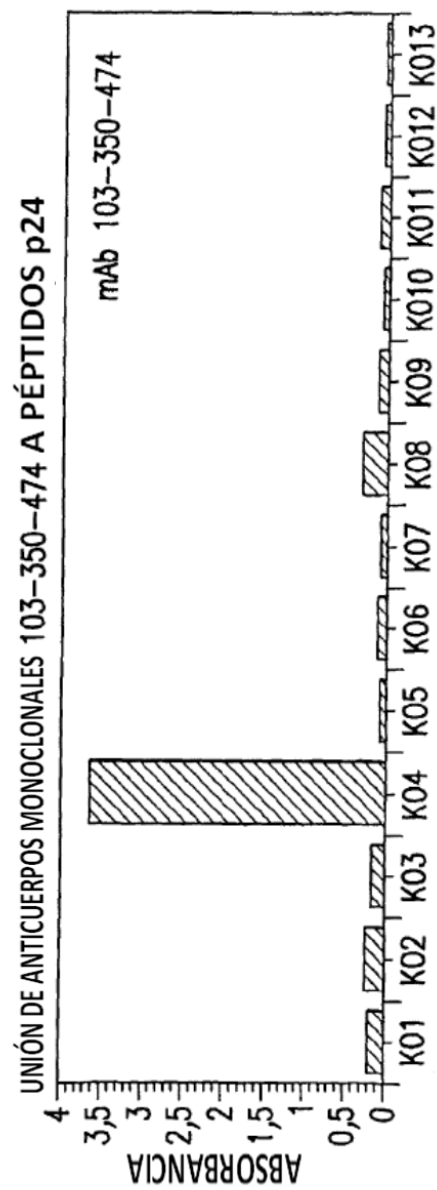


FIG.2A-2

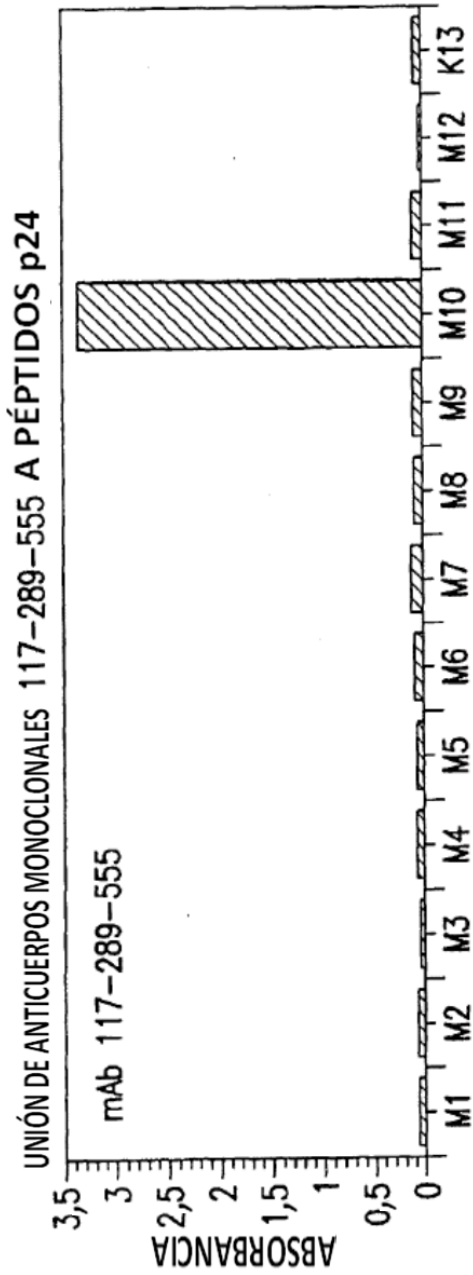


FIG.2A-3

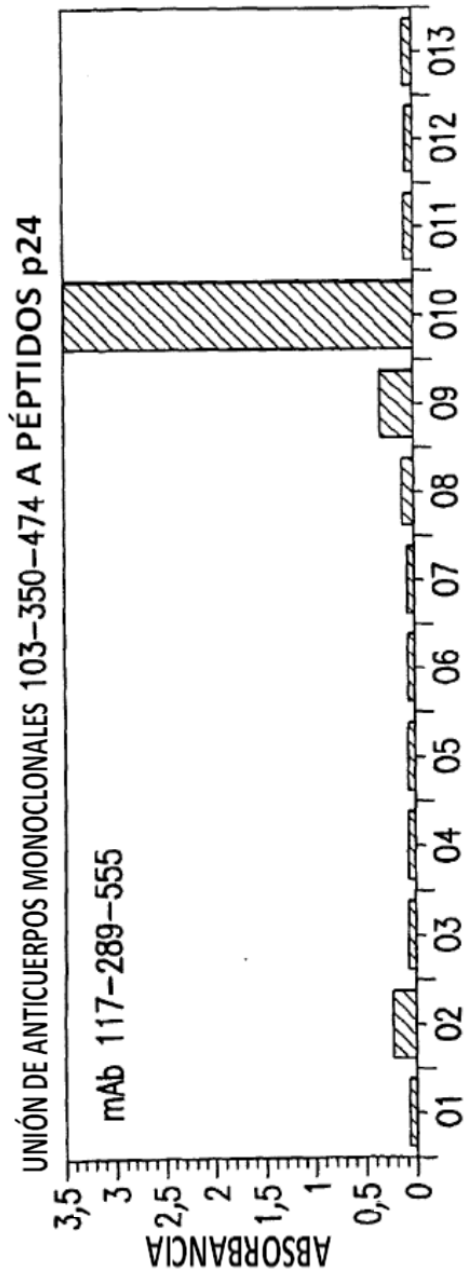
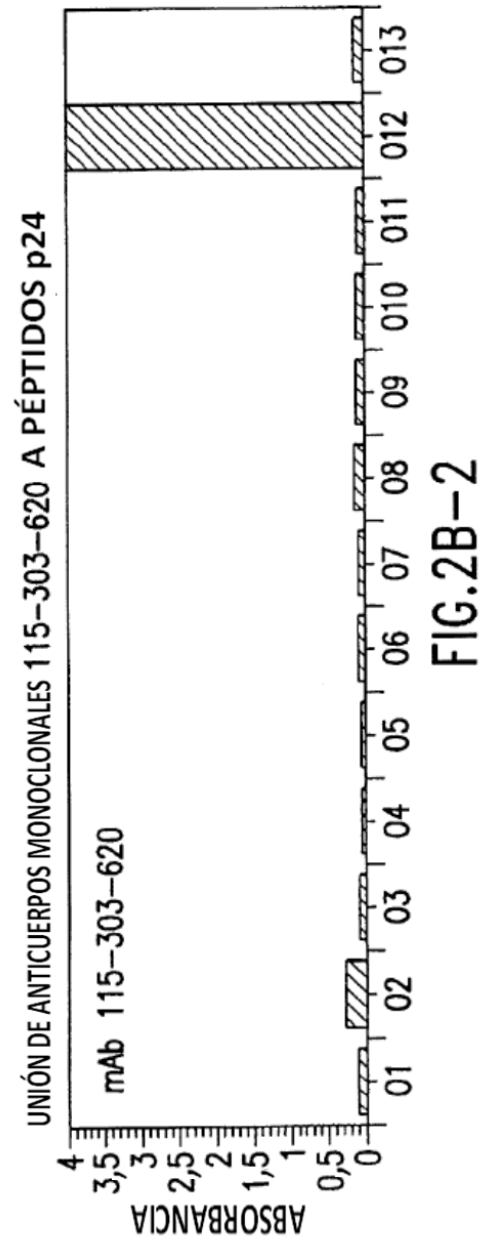
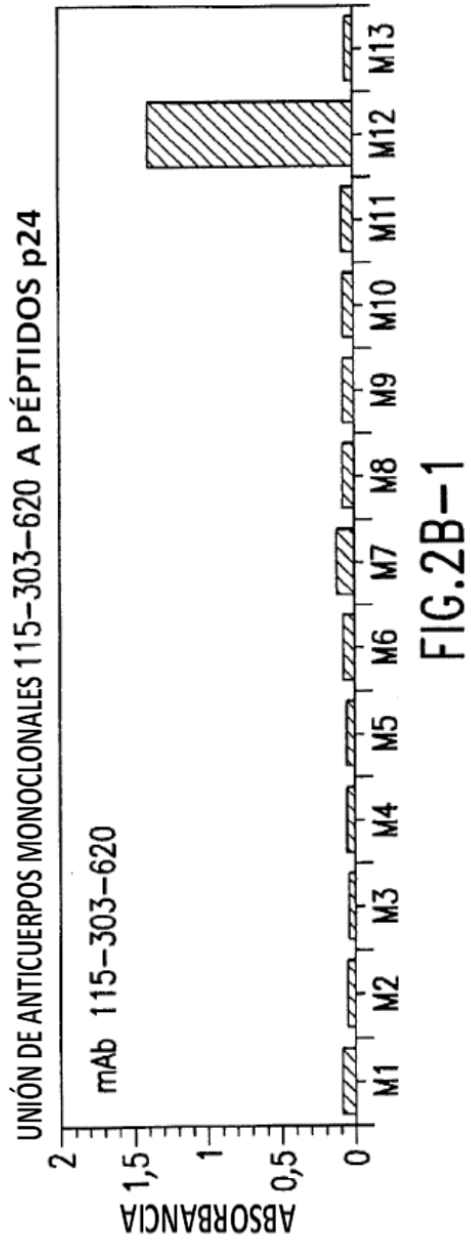


FIG.2A-4



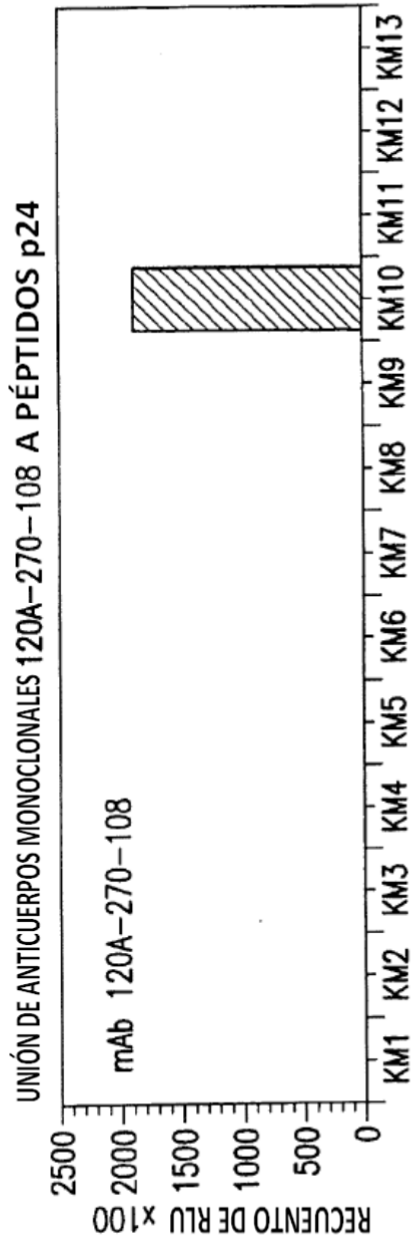


FIG.2B-3

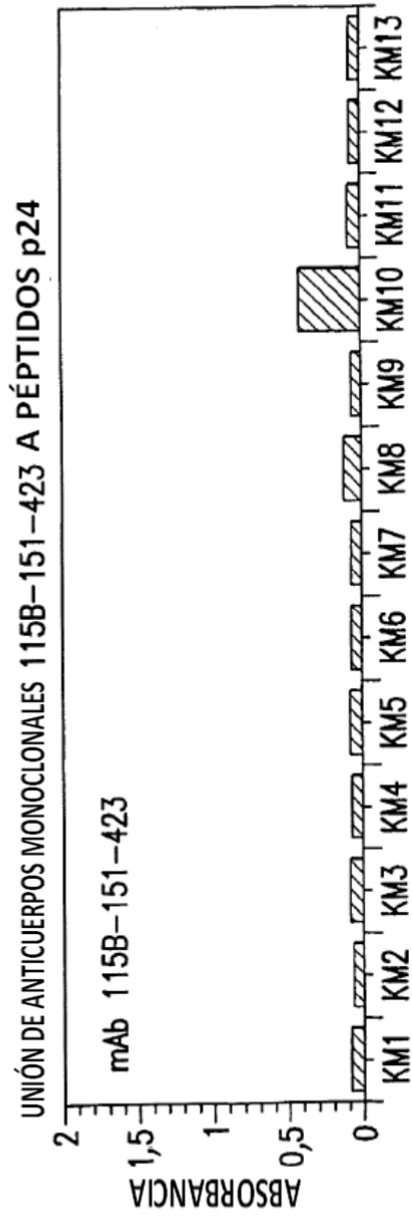
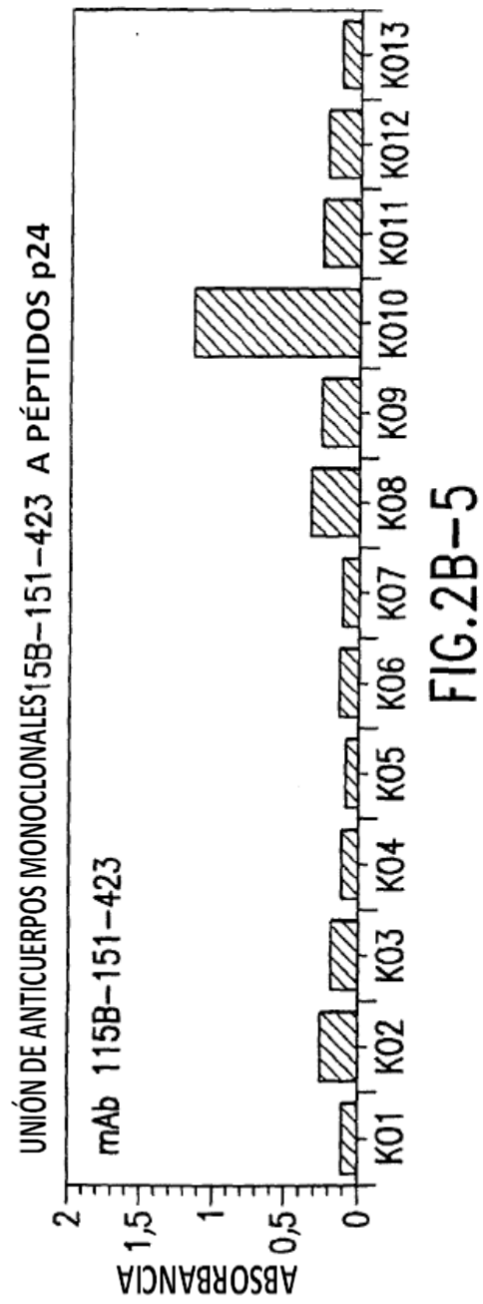


FIG.2B-4



LOCALIZACIÓN DE LOS CLONES DE ELIMINACIÓN DERIVADOS de  
p24 del GRUPO M y O de VIH-1

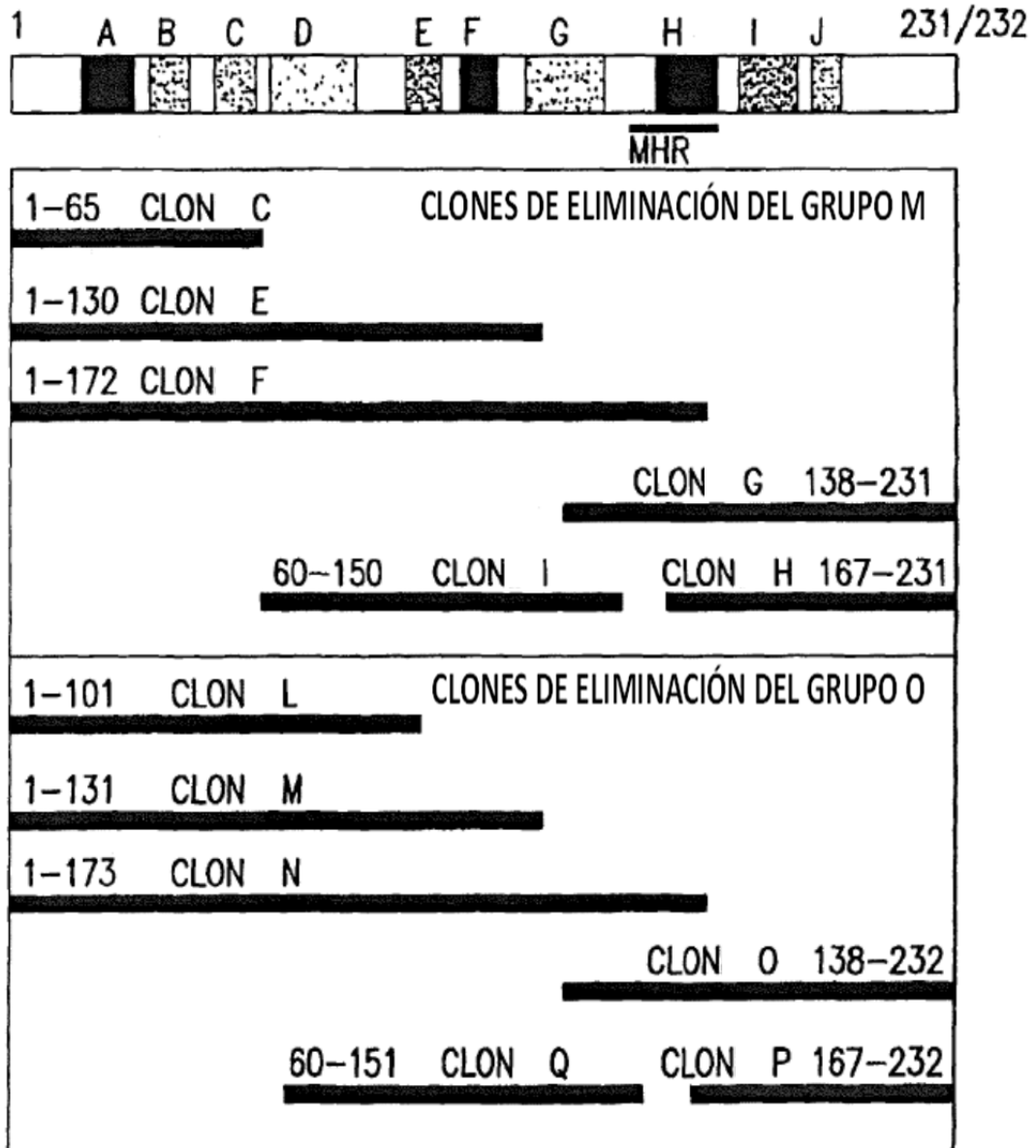


FIG.3

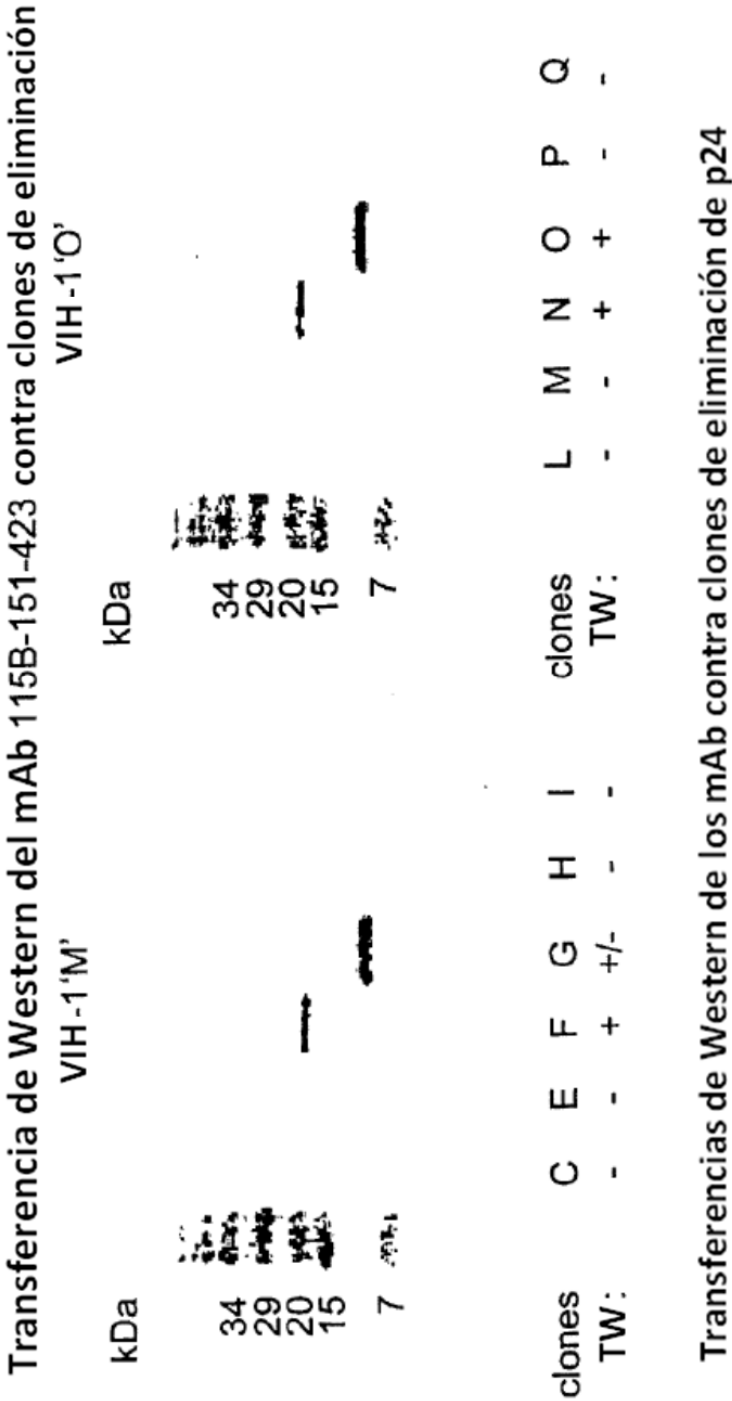


FIG.4A

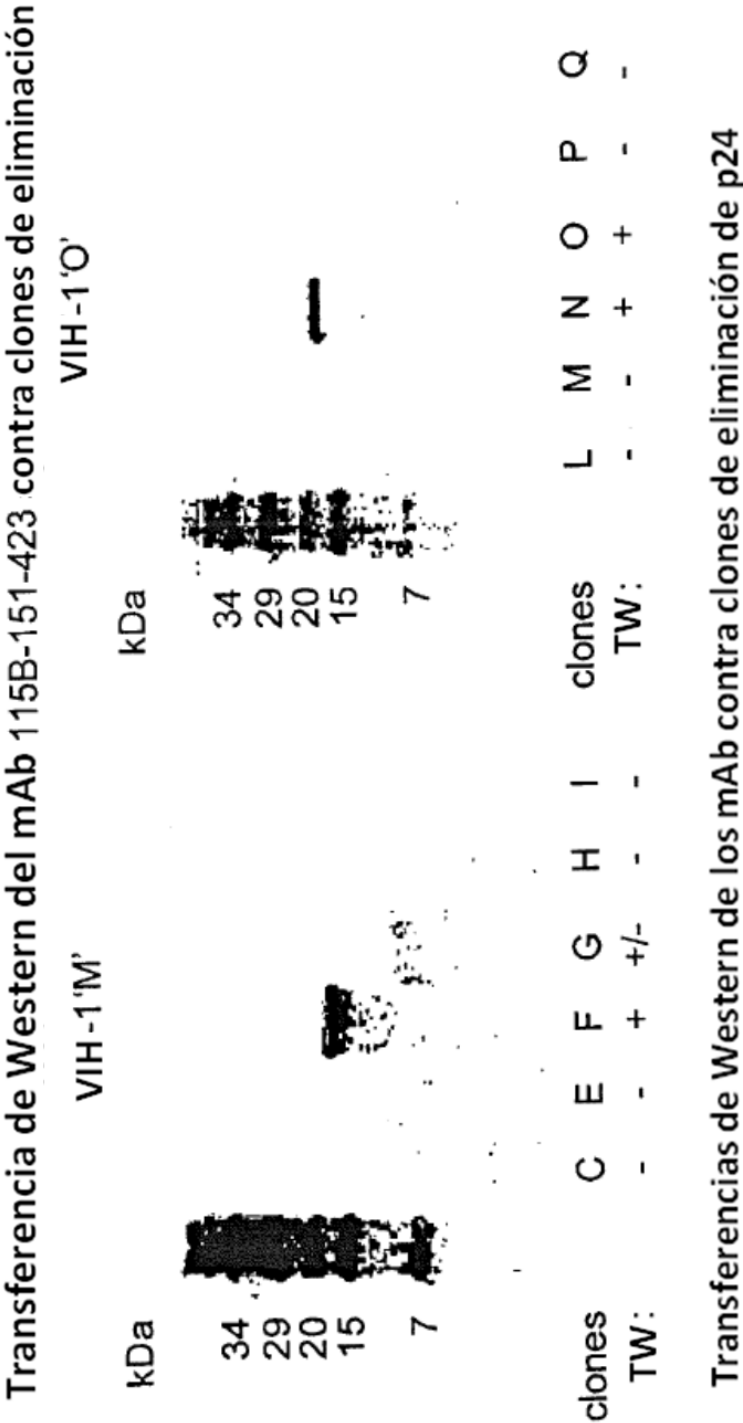


FIG.4B

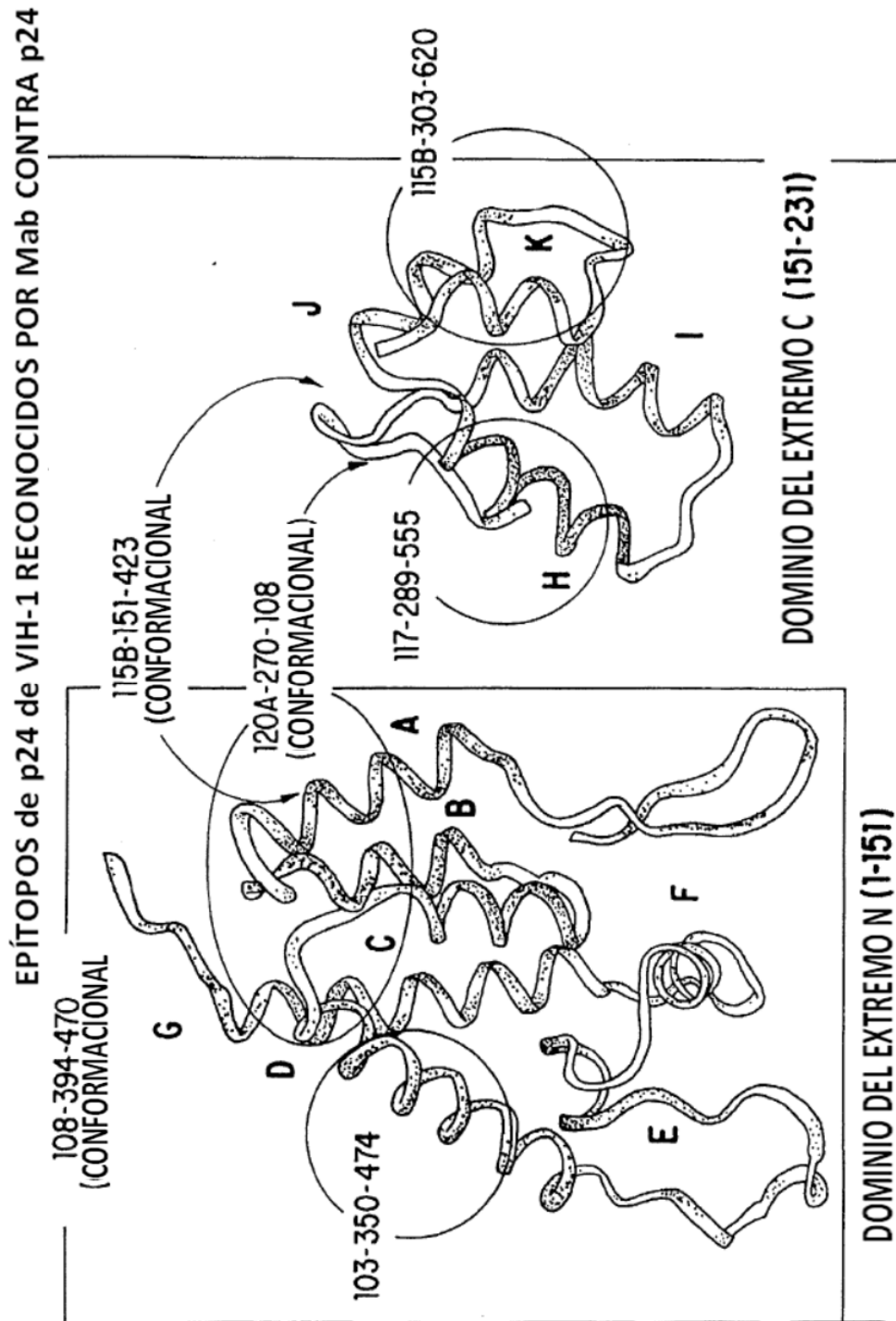


FIG. 5

DETECCIÓN DE p24M de VIH-1 POR 120A-270-108-uPARTÍCULA y  
115B-151-423-ACR EN EL INSTRUMENTO PRISM STANDALONE

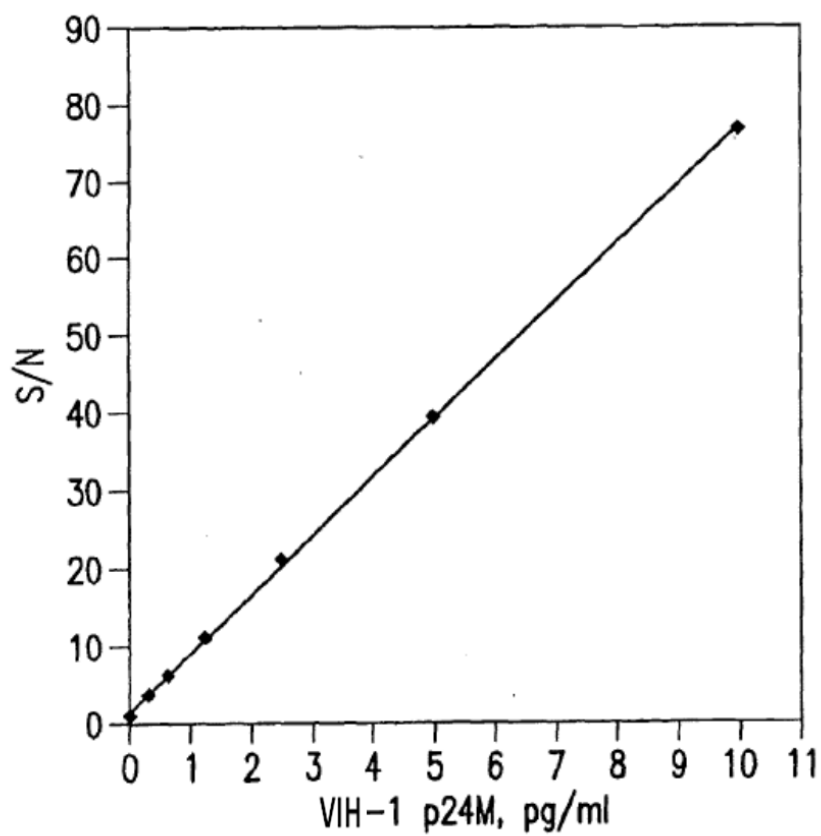


FIG.6

DETECCIÓN DE p24O de VIH-1 POR 120A-270-108-uPARTÍCULA y,  
115B-151-423-ACR EN EL INSTRUMENTO PRISM STANDALONE

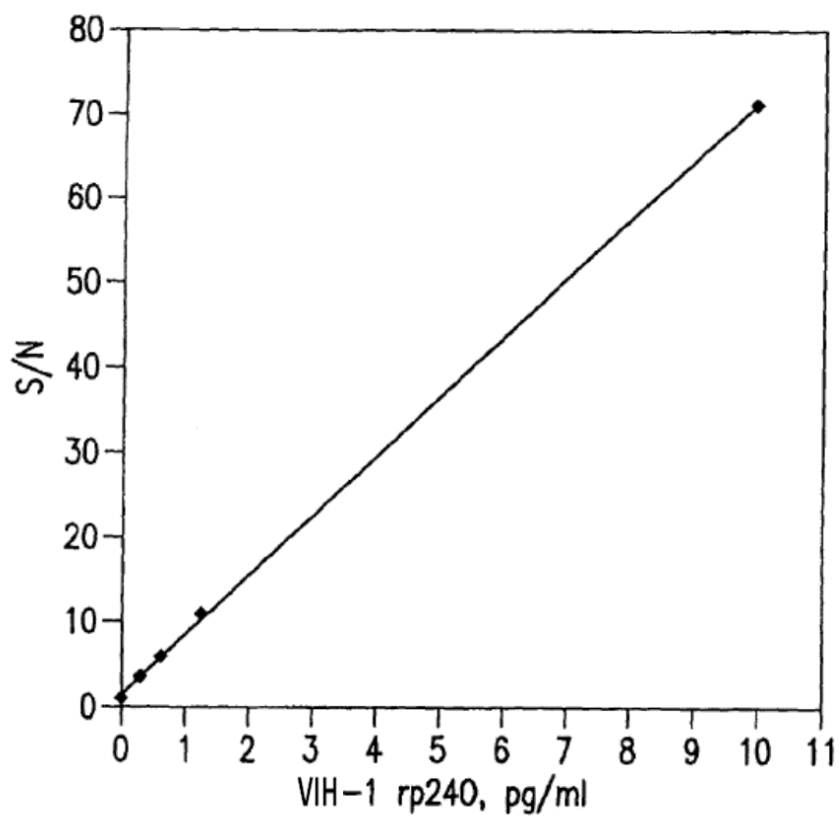


FIG.7

DETECCIÓN DE rp26 de VIH-2 POR 120A-270-108-uPARTÍCULA y  
115B-151-423-ACR EN EL INSTRUMENTO PRISM STANDALONE

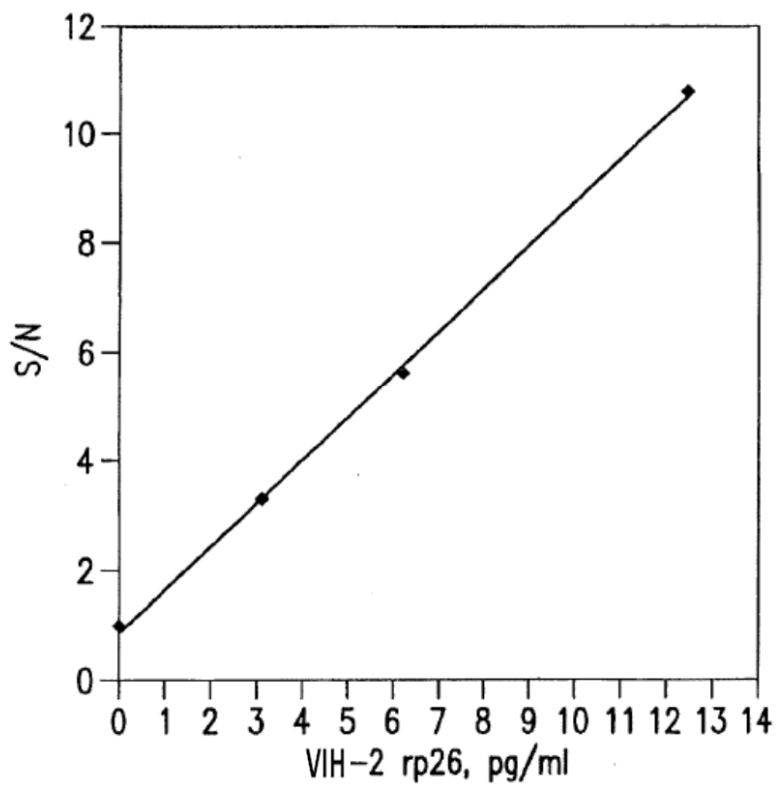


FIG.8