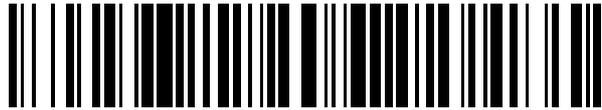


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 875**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2016 PCT/EP2016/069150**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17025603**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2016 E 16757178 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3335047**

54 Título: **Pretratamiento alcalino de parvovirus para inmunoensayos**

30 Prioridad:

**11.08.2015 EP 15180536**

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

**17.02.2020**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**FAATZ, ELKE;  
MUENCH, PETER;  
RITTER, MIRKO y  
TABARES, GLORIA**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 742 875 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

Pretratamiento alcalino de parvovirus para inmunoensayos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura en una muestra de un sujeto que comprende (a) poner en contacto dicha muestra con una base, y (b) detectar un polipéptido de la cápside de dicho virus en dicha muestra. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para preprocesar una muestra de un sujeto para la detección de un virus, que comprende poner en contacto dicha muestra con una base. Además, la presente invención se refiere a kits, usos y dispositivos relacionados con dichos procedimientos.

15 Técnica relacionada

Los virus sin envoltura, a diferencia de la mayoría de los virus con envoltura, son conocidos por su resistencia y su relativa insensibilidad a las influencias ambientales, incluyendo calor, ácido, detergentes y similares. En consecuencia, se encontró difícil desensamblar los virus sin envoltura para obtener moléculas constitutivas del virus para detectar la presencia de un virus sin envoltura.

20 Un grupo de ejemplo de virus sin envoltura, los parvovirus, son virus sin envoltura, pequeños que tienen un genoma de ADN monocatenario, no segmentado, lineal, empaquetado en una cápside. La cápside de un parvovirus consiste esencialmente en dos a cuatro proteínas de la cápside, llamadas VP1 a VP2 o VP1 a VP4, respectivamente. Las proteínas de la cápside se expresan desde un marco abierto de lectura en el genoma del virus, del que al menos una parte es idéntica para todas las proteínas VP, de modo que las proteínas VP son parcialmente idénticas en la secuencia de aminoácidos. Los parvovirus son conocidos por la excepcional estabilidad de sus cápsides, siendo insensibles a un amplio intervalo de valores de pH, disolventes y temperaturas (por ejemplo, Yuan y Parrish (2001), *Virology* 279: 546).

30 El *Primate erythroparvovirus 1* (parvovirus B19), un miembro del género *Erythroparvovirus* que infecta a los humanos, es el agente causal del eritema infeccioso, también conocido como "quinta enfermedad". Los síntomas de la enfermedad incluyen síntomas clásicos de infección vírica, como fiebre, dolor de cabeza, náuseas y diarrea. Normalmente, estos van seguidos de un exantema rojo, en particular en las mejillas, que típicamente no incluye los surcos nasogenianos, la frente y la boca; y por exantema rojo en el tronco y/o las extremidades. La infección por parvovirus B19 en mujeres embarazadas es en particular crítica, puesto que puede dar lugar al desarrollo de hidropesía fetal y anemia en el feto.

40 El diagnóstico inmunitario de la infección por parvovirus B19 normalmente se realiza en muestras de sangre, detectando proteínas de la cápside vírica. Los procedimientos usados incluyen el pretratamiento ácido de las muestras, dirigido a desensamblar las partículas víricas para incrementar la sensibilidad del ensayo (documento WO 2008/072216). También se usan sales caótopas para el mismo propósito (documento JP 2007-278902). Sin embargo, el tratamiento con ácido provoca una desnaturalización reversible, permitiendo al menos un reensamblaje parcial de las partículas víricas. Además, las inmunoglobulinas potencialmente de confusión de la muestra de sangre se pueden asimismo renaturalizar y, por tanto, no se eliminan eficazmente. Las sales caótopas pueden alterar la reacción de detección y, si se eliminan, pueden permitir la renaturalización de las cápsides y los factores de confusión. Además, su uso puede ser crítico en dispositivos que comprenden módulos de acero inoxidable, puesto que pueden provocar corrosión.

50 Problema que se va a resolver

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar medios y procedimientos mejorados para detectar parvovirus.

55 Sumario de la invención

Este problema se resuelve por los medios y procedimientos de la presente invención, con los rasgos característicos de las reivindicaciones independientes. Los modos de realización preferentes, que se podrían realizar de forma aislada o en cualquier combinación arbitraria, se enumeran en las reivindicaciones dependientes.

60 En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura en una muestra de un sujeto que comprende

(a) poner en contacto dicha muestra con una base, y

65 (b) detectar dicho polipéptido de la cápside de dicho virus en dicha muestra.

Como se usa en lo siguiente, los términos "tener", "comprender" o "incluir" o cualquier variación gramatical arbitraria de los mismos se usan de forma no exclusiva. Por tanto, estos términos se pueden referir tanto a una situación en la que, además del rasgo característico introducido por estos términos, no están presentes otros rasgos característicos en la entidad descrita en este contexto como a una situación en la que estén presentes uno o más rasgos característicos adicionales. Como ejemplo, las expresiones "A tiene a B", "A comprende a B" y "A incluye a B" se pueden referir a una situación en la que, además de B, no está presente ningún otro elemento en A (es decir, una situación en la que A consiste única y exclusivamente en B) y a una situación en la que, además de B, uno o más elementos adicionales están presentes en la entidad A, tal como el elemento C, los elementos C y D o incluso otros elementos.

Además, como se usa en lo siguiente, los términos "preferentemente", "más preferentemente", "lo más preferentemente", "en particular", "más en particular", "específicamente", "más específicamente" o términos similares se usan junto con rasgos característicos opcionales, sin restringir otras posibilidades. Por tanto, los rasgos característicos introducidos por estos términos son rasgos característicos opcionales y no pretenden restringir el alcance de las reivindicaciones de ninguna manera. La invención, como reconocerá un experto en la técnica, se puede realizar usando rasgos característicos alternativos. De forma similar, los rasgos característicos introducidos por "en un modo de realización de la invención" o expresiones similares pretenden ser rasgos característicos opcionales, sin ninguna restricción con respecto a otros modos de realización de la invención, sin ninguna restricción con respecto al alcance de la invención y sin ninguna restricción con respecto a la posibilidad de combinar los rasgos característicos introducidos de dicha manera con otros rasgos característicos opcionales o no opcionales de la invención. Además, si no se señala de otro modo, el término "aproximadamente" se refiere al valor indicado  $\pm 20\%$ .

El procedimiento para detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura de la presente invención, en un modo de realización, es un procedimiento *in vitro*. Además, puede comprender etapas además de las mencionadas de forma explícita anteriormente. Por ejemplo, otras etapas se pueden referir, por ejemplo, a obtener una muestra para la etapa a), o calcular un valor de medición o un valor de medición corregido en la etapa b). Además, una o más de dichas etapas se pueden realizar por un equipo automatizado. Por tanto, en un modo de realización, el procedimiento para detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura comprende las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto una muestra con una base, creando de este modo una mezcla de reacción que permita que la muestra interactúe con dicha base,
- (b) neutralizar opcionalmente dicha mezcla de reacción,
- (c) añadir al menos dos compuestos de unión que se unen específicamente a dicho polipéptido de la cápside, siendo uno de dichos al menos dos compuestos de unión un compuesto de captura y siendo uno de dichos al menos dos compuestos de unión un compuesto detector,
- (d) formar una mezcla de reacción inmunitaria mezclando dicha mezcla de reacción con dichos compuestos de unión,
- (e) mantener dicha mezcla de reacción inmunitaria durante un período de tiempo suficiente para permitir que dicho polipéptido de la cápside presente en dicha muestra inmunoreacciones con los al menos dos compuestos de unión para formar un producto de reacción inmunitaria, y
- (f) detectar la presencia y/o la concentración de cualquiera de dicho producto de reacción inmunitaria.

Como se entenderá por el experto en la técnica, detectar un polipéptido de la cápside de un virus en una muestra de un sujeto será normalmente indicativo de la presencia de un virus. En consecuencia, el procedimiento para detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura, en un modo de realización, es un procedimiento para detectar un virus sin envoltura en una muestra de un sujeto que comprende

- (a) poner en contacto dicha muestra con una base,
- (b) detectar un polipéptido de la cápside de dicho virus en dicha muestra, y de este modo,
- (c) detectar dicho virus.

En un modo de realización, en los procedimientos mencionados anteriormente, el polipéptido de la cápside se detecta mediante un procedimiento de detección no discriminatorio por tamaño, es decir, en un modo de realización, un procedimiento que detecta un rasgo característico de dicho polipéptido de la cápside sin detectar la masa molecular del analito detectado. Por tanto, en un modo de realización, los procedimientos mencionados anteriormente comprenden un inmunoensayo de tipo sándwich, en particular un inmunoensayo de tipo sándwich de doble anticuerpo, por ejemplo, un ELISA de tipo sándwich o un ECLIA de tipo sándwich.

El término "virus" se entiende por el experto en la técnica. El término "virus sin envoltura", como se usa en el presente documento, se refiere a un virus que tiene la cápside como cubierta más externa; en consecuencia, en un modo de realización, el virus sin envoltura es un virus que no está rodeado por una membrana lipídica. En un modo de realización, el virus sin envoltura es un reovirus, un calcivirus, un picornavirus, un parvovirus, un circovirus, un poliomavirus, un papilomavirus o un adenovirus. En un modo de realización, el virus sin envoltura es un virus patógeno humano. Por tanto, en otro modo de realización, el virus sin envoltura es un reovirus patógeno humano, un calcivirus patógeno humano, un picornavirus patógeno humano, un parvovirus patógeno humano, un circovirus patógeno humano, un poliomavirus patógeno humano, un papilomavirus patógeno humano o un adenovirus patógeno humano.

En un modo de realización, el virus sin envoltura es un virus de la familia *Parvoviridae*. El término "familia *Parvoviridae*", que también se denomina genéricamente "parvovirus", es conocido por el experto en la técnica. La familia de virus *Parvoviridae* tiene dos subfamilias, la *Densovirinae* que comprende los géneros *Ambidensovirus*, *Brevidensovirus*, *Hepandensovirus*, *Iteradensovirus* y *Penstylidensensovirus*; y la *Parvovirinae*, que comprende los géneros *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Tetraparvovirus*. En consecuencia, el término "virus de la familia *Parvoviridae*" se refiere a un virus clasificado o clasificable en base a la similitud del genoma, como miembro de dicha familia de virus. En un modo de realización, el virus es un virus de la subfamilia *Parvovirinae*. En otro modo de realización, el virus es un virus del género *Erythroparvovirus*. En otro modo de realización, el virus es el *Primate erythroparvovirus 1* (parvovirus B19).

El término "poner en contacto", como se usa en el contexto de los procedimientos de la presente invención, se entiende por el experto en la técnica. En un modo de realización, el término se refiere a poner un compuesto, en particular una base, de la presente invención en contacto físico con una muestra o con otro compuesto y, de este modo, permitir que el compuesto y el otro compuesto interactúen. Como se usa en el presente documento, el término "mezcla de reacción" se refiere a cualquier mezcla que pone en contacto un primer compuesto con un segundo compuesto, por ejemplo, una base con una muestra, permitiendo que reaccionen dicho primer y segundo compuesto.

El término "base", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que induce un incremento del pH en una solución acuosa. En un modo de realización, la base es una base de Brønsted-Lowry. En otro modo de realización, la base es un compuesto que comprende o genera iones hidróxido en una solución acuosa. En otro modo de realización, la base es un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo, LiOH, NaOH, KOH o RbOH; o un hidróxido de metal alcalinotérreo, por ejemplo, Be(OH)<sub>2</sub>, Mg(OH)<sub>2</sub> o Ca(OH)<sub>2</sub>. En otro modo de realización, la base tiene un valor de pK<sub>B</sub> de como máximo 4, en un modo de realización, como máximo 3, en otro modo de realización, como máximo 2. En otro modo de realización, la base es hidróxido de sodio o hidróxido de potasio.

En un modo de realización, poner en contacto una muestra con una base comprende incubar dicha muestra a un pH de al menos 10,5, en otro modo de realización a un pH de al menos 11, en otro modo de realización a un pH de al menos 11,5, en otro modo de realización a un pH de al menos 11,7. Como se entenderá por el experto en la técnica, la incubación prolongada a pH fuertemente alcalino puede provocar la hidrólisis de los polipéptidos, incluyendo los polipéptidos de la cápside. En consecuencia, en un modo de realización, la muestra se incuba a un pH de como máximo 14, en otro modo de realización, como máximo 13. En otro modo de realización, la muestra se incuba a un pH de 12±1,5, en un modo de realización a un pH de 11,5±1, en otro modo de realización a un pH de 11,5±0,5. En un modo de realización, el pH de una solución acuosa se determina de acuerdo con la norma DIN EN ISO 10523 (abril de 2012). En consecuencia, en un modo de realización, poner en contacto una muestra con una base es poner en contacto una muestra con un tampón de un pH como se indica anteriormente, en un modo de realización un tampón que comprende un compuesto tampón que tiene al menos un pK<sub>B</sub> a un pH como se indica anteriormente.

En un modo de realización, poner en contacto una muestra con una base comprende incubar la muestra en presencia de la base durante al menos 2 minutos, en un modo de realización al menos 5 minutos, en otro modo de realización al menos 9 minutos. Como se entenderá por el experto en la técnica, la incubación prolongada a pH fuertemente alcalino puede provocar la hidrólisis de los polipéptidos, incluyendo los polipéptidos de la cápside. En consecuencia, en un modo de realización, la muestra se incuba en presencia de la base durante menos de dos horas, en un modo de realización menos de una hora, en otro modo de realización menos de 30 min. En consecuencia, en un modo de realización, la muestra se incuba en presencia de la base durante de desde 2 minutos a 60 minutos, en un modo de realización de desde 5 minutos a 20 minutos, en otro modo de realización de desde 9 minutos a 15 minutos.

Por tanto, en un modo de realización, poner en contacto una muestra con una base comprende incubar la muestra a un pH de 12±1,5 durante de desde 2 minutos a 60 minutos, en un modo de realización de desde 5 minutos a 20 minutos, en otro modo de realización de desde 9 minutos a 15 minutos. En otro modo de realización, poner en contacto una muestra con una base comprende incubar la muestra a un pH de 11,5±1 durante de desde 2 minutos a 60 minutos, en un modo de realización de desde 5 minutos a 20 minutos, en otro modo de realización de desde 7 minutos a 15 minutos. En otro modo de realización, poner en contacto una muestra con una base comprende incubar la muestra a un pH de 11±0,5 durante de desde 2 minutos a 60 minutos, en un modo de realización de desde 5 minutos a 20 minutos, en otro modo de realización de desde 9 minutos a 15 minutos.

En un modo de realización, poner en contacto la muestra con una base comprende incubar dicha muestra a una temperatura de desde 10 °C a 50 °C, en un modo de realización de desde 20 °C a 45 °C, en otro modo de realización de desde 30 °C a 40 °C, en otro modo de realización a una temperatura de 37±3 °C.

Como se entenderá, dependiendo en particular de la naturaleza del/de los compuesto(s) de unión usado(s), puede ser ventajoso neutralizar la base antes de poner en contacto la muestra tratada con base con un compuesto de unión. Por tanto, en un modo de realización, el procedimiento comprende la etapa adicional de neutralizar la base antes de detectar el polipéptido de la cápside en la etapa b). Sin embargo, la neutralización también puede ser innecesaria, por ejemplo, en caso de que la muestra tratada con base se diluya fuertemente después del tratamiento con base y/o en caso de que el/los compuesto(s) de unión usado(s) sea(n) insensible(s) a condiciones alcalinas. En un modo de realización, la muestra se neutraliza a un pH de 8±2, en un modo de realización a un pH de 7±2, en otro modo de realización a un pH de 7±1. El experto en la técnica conoce procedimientos apropiados para neutralizar una base en una solución acuosa. En un modo de realización, la neutralización se consigue añadiendo un compuesto tampón tamponado a un pH apropiado. En un modo de realización, la neutralización se realiza antes de que la muestra se ponga en contacto con un compuesto de unión de la presente invención. En otro modo de realización, el/los compuesto(s) de unión de la presente invención está(n) comprendido(s) en la solución de neutralización usada para la neutralización, es decir, la neutralización se realiza mientras se pone en contacto dicho virus con un polipéptido de unión.

En un modo de realización, los polipéptidos desnaturalizados no se eliminan de la muestra después del tratamiento alcalino, en particular después de neutralizar la base. En otro modo de realización, los polipéptidos desnaturalizados no se solubilizan mediante la adición de un agente caótopo, en particular un detergente caótopo, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio. Sin embargo, se contempla por la presente invención que después del tratamiento alcalino se añade un detergente débil, en un modo de realización no iónico, por ejemplo, para asegurar la humectación de una superficie sólida.

Como se usa en el presente documento, el término "detectar" se refiere a detectar al menos un rasgo característico, en un modo de realización, un rasgo característico inmunitario, de un polipéptido de la cápside de un virus que se va a detectar en la muestra, cualitativa o cuantitativamente. Un rasgo característico de acuerdo con la presente invención, en un modo de realización, es un rasgo característico estructural de un polipéptido de la cápside que facilita la detección del polipéptido de la cápside en una muestra, por ejemplo, por medio de un compuesto de unión que se une específicamente a dicho rasgo característico. En un modo de realización, dicho rasgo característico facilita la identificación, en otro modo de realización la cuantificación, del polipéptido de la cápside por medios inmunitarios. Los rasgos característicos utilizables típicos son rasgos característicos que facilitan la diferenciación de dicho polipéptido de la cápside de otros compuestos químicos presentes en una muestra. En un modo de realización, detectar un polipéptido de la cápside es establecer si un polipéptido de la cápside está presente o ausente en la muestra en un valor por encima del límite de detección del procedimiento. Los procedimientos para establecer un límite de detección para un procedimiento dado son conocidos por el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, experimentos de valoración por dilución. En otro modo de realización, detectar es detectar semicuantitativa o cuantitativamente la cantidad o valor de un polipéptido de la cápside o virus en una muestra. Para la detección cuantitativa, se detectará la cantidad absoluta o precisa del polipéptido de la cápside o virus o bien se detectará la cantidad relativa del polipéptido de la cápside o virus. La cantidad relativa se puede detectar en un caso donde la cantidad precisa no se puede detectar o no se detectará. En dicho caso, se puede detectar si la cantidad en la que está presente el polipéptido de la cápside o virus se incrementa o disminuye con respecto a una segunda muestra que comprende dicho polipéptido de la cápside o virus en una segunda cantidad, en un modo de realización, predeterminada.

Como se entenderá por el experto en la técnica, la detección del polipéptido de la cápside dependerá del formato de ensayo elegido. En un modo de realización, el ensayo es un ensayo de tipo sándwich en el que un analito, por ejemplo, un virus, un capsómero del mismo, o un polipéptido de la cápside del mismo, se une a un compuesto de captura unido a una superficie sólida, y en el que la cantidad de analito capturado se detecta por unión de un compuesto detector como se especifica en el presente documento a continuación a dicho analito capturado. En un modo de realización, el compuesto de captura y/o detector es un anticuerpo y el ensayo de tipo sándwich es un inmunoensayo de tipo sándwich. Como se entenderá por el experto en la técnica, en un modo de realización, un rasgo característico detectable del analito puede estar presente en el analito más de una vez; en dicho caso, tanto el compuesto de captura como el compuesto detector pueden reconocer dicho rasgo característico; o el compuesto de captura reconoce un primer rasgo característico y el compuesto detector reconoce un segundo rasgo característico, es decir, estructuralmente diferente. Sin embargo, un rasgo característico detectable específica del analito puede estar presente en el analito solo una vez; en dicho caso, en un modo de realización, el compuesto de captura reconoce un primer rasgo característico y el compuesto detector reconoce un segundo rasgo característico, es decir, estructuralmente diferente.

En un modo de realización, el rasgo característico del virus y/o del polipéptido de la cápside detectado es un epítipo comprendido en un polipéptido de la cápside de dicho virus. El término "polipéptido de la cápside", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier polipéptido comprendido en una cápside de un virus de la presente

invencción en una cantidad detectable. En otro modo de realización, el término polipéptido de la cápside se refiere a un polipéptido que es un componente estructural de la cápside vírica, en el que, en un modo de realización, un componente estructural de una cápside es un componente que se requiere para formar una cápside estructuralmente normal y/o para formar una partícula vírica infecciosa. En otro modo de realización, el polipéptido de la cápside es un polipéptido que está presente en una cápside vírica en al menos 5 copias por cápside, en un modo de realización, al menos 10 copias por cápside. En un modo de realización, el virus es un parvovirus y el polipéptido de la cápside es al menos uno de los polipéptidos de la cápside vírica VP1, VP2, VP3 y VP4. Así, en un modo de realización, el procedimiento para detectar un polipéptido de la cápside de un virus de la familia *Parvoviridae* de la presente invencción comprende detectar al menos uno de los polipéptidos de la cápside vírica VP1, VP2, VP3 y VP4.

El procedimiento de la presente invencción comprende detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura, en un modo de realización, un virus de la familia *Parvoviridae*, como se especifica anteriormente; en consecuencia, el "analito" que se va a detectar en dicho procedimiento, en un modo de realización, es dicho polipéptido de la cápside. Como se entenderá por el experto en la técnica, el procedimiento puede comprender además detectar otros adicionales, por ejemplo, uno o más polipéptidos de la cápside adicionales. Como se entenderá también por el experto en la técnica, detectar un polipéptido de la cápside vírica como un analito, en un modo de realización, incluye detectar oligómeros de dicho polipéptido de la cápside y/o puede incluir detectar las cápsides intactas.

En un modo de realización, detectar un polipéptido de la cápside comprende poner en contacto la muestra con un compuesto de unión. Como se usa en el presente documento, el término "compuesto de unión" se refiere a una molécula química que se une al analito de la presente invencción, en un modo de realización, a un polipéptido de la cápside. En un modo de realización, el compuesto de unión es una molécula orgánica o un complejo de la misma, en otro modo de realización, una macromolécula biológica, en particular un polipéptido o un complejo del mismo. En un modo de realización, el compuesto de unión es un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal. Por tanto, como se usa en el presente documento, el término "producto de reacción inmunitaria" se refiere a, en un modo de realización específico, un complejo entre al menos un anticuerpo y un polipéptido de la cápside de la presente invencción. En un modo de realización, el compuesto de unión se une, directa o indirectamente, al analito de la presente invencción con suficiente afinidad para permitir la detección del complejo que comprende el analito y el compuesto de unión. En un modo de realización, la constante de disociación ( $K_d$ ) del complejo analito/compuesto de unión es como máximo  $10^{-7}$  mol/l, en otro modo de realización, como máximo  $10^{-8}$  mol/l, en otro modo de realización, como máximo  $10^{-9}$  mol/l. En un modo de realización, el compuesto de unión se une, directa o indirectamente, al polipéptido de la cápside de la presente invencción con suficiente afinidad para permitir la detección del complejo que comprende el polipéptido de la cápside y el compuesto de unión. En un modo de realización, el compuesto de unión es un compuesto que se une específicamente a un analito, en particular a un polipéptido de la cápside, de la presente invencción. En un modo de realización, el compuesto de unión se une específicamente al (i) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino o al (ii) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino; por tanto, en un modo de realización, el compuesto de unión se une a un epítipo de un polipéptido de la cápside no desnaturalizado por tratamiento alcalino como se especifica en otra parte en el presente documento. En otro modo de realización, el compuesto de unión se une a un epítipo contiguo (lineal), es decir, un epítipo formado por aminoácidos que están contiguos en la secuencia de aminoácidos del analito, por ejemplo, el polipéptido de la cápside. Por tanto, en un modo de realización, el compuesto de unión es un compuesto de unión que no se une a un epítipo conformacional del analito. En un modo de realización, el compuesto de unión que se une específicamente al (i) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino o al (ii) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino es un compuesto de unión identificado por el procedimiento descrito en el presente documento a continuación.

Como apreciará el experto en la técnica, el término "que se une específicamente", o una variación gramatical del mismo, se usa para indicar que otros compuestos, típicamente biomoléculas, presentes en una muestra no se unen significativamente a un ligando, en particular un compuesto de unión, de la presente invencción; en un modo de realización, esto no excluye la unión de compuestos químicos, por ejemplo, compuestos interferentes, a regiones de los compuestos de unión no implicados en la interacción con el analito. En un modo de realización, el nivel de unión de un compuesto de unión a un compuesto distinto del analito da como resultado una afinidad de unión que es como máximo un 10 % o menos, un 5 % o menos, un 2 % o menos, o un 1 % o menos de la afinidad al analito, respectivamente.

En un modo de realización, detectar un polipéptido de la cápside comprende capturar un polipéptido de la cápside en una superficie sólida por medio de un compuesto de captura. Como se usa en el presente documento, el término "compuesto de captura" se refiere a un compuesto de unión fijado o adaptado para fijarse a una superficie sólida como se especifica en otra parte en el presente documento. Como se entenderá el experto en la técnica, fijar un compuesto de captura a una superficie sólida y poner en contacto dicho compuesto de captura unido a la superficie sólida con una muestra permite separar específicamente un analito unido por dicho compuesto de captura, si está presente, de otros compuestos comprendidos en dicha muestra. Los procedimientos de fijación de compuestos de unión, por ejemplo, moléculas biológicas, típicamente polipéptidos, a superficies sólidas son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, unión por interacción hidrófoba, biotinylación y unión por medio de estreptavidina inmovilizada, unión covalente, interacción anticuerpo-antígeno, y similares, o una combinación de estas

interacciones. En un modo de realización, el compuesto de captura también puede ser un complejo de captura. En un modo de realización, el compuesto de captura es un anticuerpo. En otro modo de realización, el compuesto de captura es un anticuerpo monoclonal. En otro modo de realización, el compuesto de captura es un anticuerpo, es decir, un anticuerpo de captura, en particular un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, el anticuerpo de captura se acopla covalentemente a biotina.

En un modo de realización, detectar un polipéptido de la cápside comprende poner en contacto dicho polipéptido de la cápside con un compuesto detector. Como se usa en el presente documento, el término "compuesto detector" se refiere a un compuesto de unión enlazado a un indicador como se especifica en otra parte en el presente documento. En un modo de realización, el compuesto detector no está unido a una superficie sólida y no está adaptado para unirse a una superficie sólida. En un modo de realización, el compuesto detector es un compuesto que se une directamente al analito de la invención, en un modo de realización, a un polipéptido de la cápside. En un modo de realización, el compuesto detector también puede ser un complejo detector. El experto en la técnica sabe cómo enlazar un compuesto de unión o complejo de unión a un indicador, dependiendo del indicador seleccionado. En un modo de realización, el enlace entre el agente de unión y el indicador en el compuesto detector es un enlace covalente. En un modo de realización, el compuesto detector es un anticuerpo, es decir, un anticuerpo detector. En otro modo de realización, el compuesto detector es un anticuerpo monoclonal. En otro modo de realización, el compuesto detector es un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal, acoplado covalentemente a un complejo que comprende un ion rutenio, por ejemplo, un complejo  $\text{Tris}(2,2'\text{-bipiridil})\text{rutenio(II)}$ .

En un modo de realización, el agente de unión que comprende el compuesto de captura y el compuesto de unión del compuesto detector no son idénticos.

El término "indicador", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto adaptado para hacer detectable la presencia de una molécula o complejo que comprende dicho indicador. Típicamente, el indicador tiene una propiedad detectable, típicamente una propiedad óptica y/o enzimática. Sin embargo, también se contempla que dicha propiedad detectable es la propiedad de emitir radioactividad.

El término "propiedad óptica", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier propiedad que se pueda detectar por un instrumento óptico. Específicamente, la propiedad ópticamente determinable puede ser o puede comprender al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en: una propiedad de reflexión, una propiedad de transmisión, una propiedad de emisión, una propiedad de dispersión, una propiedad de fluorescencia, una propiedad de fosforescencia, una propiedad de difracción y una propiedad de polarización. Otras propiedades ópticas contempladas por la presente invención son el color, la fluorescencia, la luminiscencia o la refracción. En un modo de realización, una propiedad ópticamente determinable como se denomina en el presente documento se refiere a una propiedad de un compuesto químico que se puede detectar ópticamente, tal como absorción de luz, emisión de luz, remisión de luz o propiedades asociadas con las mismas. Se entenderá que detectar una propiedad ópticamente determinable como se usa en el presente documento engloba la detección de la presencia de una propiedad que no era detectable anteriormente, la detección de la ausencia de una propiedad que se ha detectado anteriormente y la detección de cambios cuantitativos de una propiedad, es decir, la detección del cambio de la intensidad de señal que se correlaciona con la magnitud del cambio de la al menos una propiedad óptica. Se entiende que el término "propiedad ópticamente determinable", en un modo de realización, también se refiere a la electroquimioluminiscencia, que también es conocida como quimioluminiscencia electrogenerada.

El término "propiedad enzimática", como se usa en el presente documento, se refiere a una propiedad de un indicador de producir un producto detectable a partir de un sustrato por medio de catálisis biológica. En consecuencia, una propiedad enzimática se confiere típicamente por la presencia de un polipéptido que tiene dicha propiedad enzimática en dicho indicador. Típicamente, la propiedad enzimática es al menos una actividad enzimática seleccionada del grupo que consiste en: actividad fosfatasa (por ejemplo, en fosfatasa alcalina), actividad peroxidasa (por ejemplo, en peroxidasa de rábano picante) y actividad glucosidasa (por ejemplo, en beta-galactosidasa). Los sustratos típicos para actividades enzimáticas son bien conocidos en la técnica. Típicamente, dicha actividad enzimática produce un producto que tiene una propiedad óptica determinable como se especifica en el presente documento anteriormente, o/y dicha actividad enzimática produce un producto que se puede determinar mediante un instrumento eléctrico.

Como se usa en el presente documento, el término "superficie sólida" se refiere a cualquier superficie sólida adecuada adaptada para unirse al compuesto de captura de la presente invención y adaptada para separarse, por ejemplo, por medios físicos, de una muestra. En un modo de realización, dicha superficie sólida es una superficie de una microesfera, en un modo de realización, una microesfera, por ejemplo, una microesfera magnética o paramagnética. En un modo de realización, dicha superficie se adapta para mejorar la unión del compuesto de captura, por ejemplo fijando, covalente o no covalentemente, las moléculas que se unen a una subestructura del compuesto de captura. Las moléculas típicas que se unen a una subestructura del compuesto de captura son, por ejemplo, anticuerpos, estreptavidina, iones de níquel complejados y similares. En otro modo de realización, la superficie sólida se une a dicho compuesto de captura por enlaces covalentes y/o no covalentes, por ejemplo, por interacción hidrófoba. Por tanto, en un modo de realización, dicha superficie sólida es una superficie de una placa de múltiples conglomerados. En un modo de realización, la superficie de la placa de múltiples conglomerados se

pretrata para incrementar la afinidad y/o la capacidad de unión de un compuesto de captura. Pretratamientos adecuados son conocidos en la técnica.

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra que se sospecha que comprende el virus o partes constituyentes del mismo de la presente invención. En un modo de realización, la muestra es una muestra que se sospecha que comprende un polipéptido de la cápside de un virus de la presente invención. En un modo de realización, la muestra es o comprende una muestra de un líquido corporal, una muestra de un tejido o un órgano, o una muestra de líquido de lavado/enjuague o un hisopado o frotis obtenido de una superficie corporal externa o interna. En un modo de realización, las muestras de heces, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero, plasma o líquido lagrimal se incluyen como muestras mediante el procedimiento de la presente invención. Las muestras se pueden obtener mediante el uso de cepillos, hisopos (de algodón), espátulas, líquidos de enjuague/lavado, dispositivos de biopsia en sacabocados, punción de cavidades con agujas o lancetas, o mediante instrumentación quirúrgica. Sin embargo, las muestras obtenidas mediante técnicas bien conocidas que incluyen, en un modo de realización, raspados, frotis o biopsias del aparato genitourinario, regiones perianales, conducto anal, la cavidad bucal, el tracto aerodigestivo superior y la epidermis también se incluyen como muestras de la presente invención. Los líquidos sin células se pueden obtener de los líquidos corporales o de los tejidos u órganos mediante técnicas de lisis tales como homogeneización y/o mediante técnicas de separación tales como filtración o centrifugación. En un modo de realización, las muestras se obtienen de líquidos corporales que se sabe que comprenden polipéptidos de la cápside de virus y/o virus de la presente invención, es decir, en un modo de realización, sangre, plasma, suero, saliva o similares. Se debe entender que una muestra se puede procesar adicionalmente para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. En particular, las células se pueden eliminar de la muestra mediante procedimientos y medios conocidos en la técnica. En un modo de realización, la muestra es una muestra que comprende inmunoglobulinas, en un modo de realización, una muestra de sangre, suero o plasma.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, en un modo de realización un mamífero, en otro modo de realización un primate, en otro modo de realización un ser humano. En un modo de realización, el sujeto de acuerdo con la presente invención es un sujeto que se sospecha que está infectado con un parvovirus; en consecuencia, en un modo de realización, el sujeto es un sujeto que muestra al menos uno, en otro modo de realización, al menos dos síntomas de infección por parvovirus como es conocido por el experto en la técnica y como se especifica en otra parte en el presente documento. Sin embargo, también se contempla que el sujeto sea un pariente, un miembro de la familia, un compañero de juegos y/o un tutor de un menor, en el que se diagnosticó que dicho menor estaba infectado con un parvovirus.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad de unión deseada como se especifica en otra parte en el presente documento. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir, adicionalmente, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen en general en, por ejemplo, Abbas *et al.*, Cellular and Mol. Immunology, 4.<sup>a</sup> ed., W.B. Saunders, Co. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se define a continuación. Los términos se refieren en particular a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, en un modo de realización, que comprende la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario, nanoanticuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, en el que su nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación con antígeno y todavía se puede reticular con el antígeno. "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En un modo de realización, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv) se pueden enlazar covalentemente un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera mediante un conector peptídico flexible, de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables (HVR) de cada dominio variable

interactúan para definir un sitio de unión a antígeno. Conjuntamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo. El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, en el documento EP 0 404 097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Hollinger *et al.*, PNAS USA 90 (1993) 6444-6448. También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales comprendidos en la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. En determinados modos de realización, un anticuerpo monoclonal de este tipo incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a un analito, en el que la secuencia polipeptídica de unión a analito se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a analito de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tales como un grupo de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Se debe entender que una secuencia de unión a diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas al no estar típicamente contaminadas por otras inmunoglobulinas.

Ventajosamente, en el trabajo subyacente a la presente invención se encontró que el tratamiento alcalino provoca que las cápsides de virus sin envoltura, por ejemplo, las cápsides de parvovirus, se desensamblen, provocando un incremento en la intensidad de la señal en los procedimientos que detectan estos polipéptidos de la cápside. Además, los polipéptidos de la cápside, a diferencia de la mayoría de los otros polipéptidos, permanecen solubles incluso después de un tratamiento fuertemente alcalino. En consecuencia, se encontró que el pretratamiento alcalino incrementa la señal específica de los polipéptidos de la cápside, mientras que la señal de los compuestos interferentes disminuyó.

Las definiciones realizadas anteriormente se aplican *mutatis mutandis* a lo siguiente. Las definiciones y explicaciones adicionales realizadas más adelante también se aplican a todos los modos de realización descritos en la presente memoria descriptiva *mutatis mutandis*.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para preprocesar una muestra de un sujeto para la detección de un virus, que comprende poner en contacto dicha muestra con una base.

El procedimiento para preprocesar una muestra de un sujeto también puede comprender etapas además de las mencionadas de forma explícita. Además, el procedimiento, en un modo de realización, es un procedimiento *in vitro*. En un modo de realización, el virus que se va a detectar es un virus sin envoltura, en otro modo de realización, un virus de la familia *Parvoviridae*, como se especifica en el presente documento anteriormente.

La presente invención también se refiere a un kit para detectar un virus en una muestra, que comprende una base y al menos un, en un modo de realización al menos dos, compuesto(s) de unión que se une(n) específicamente a dicho virus.

El término "kit", como se usa en el presente documento, se refiere a una colección de los compuestos, medios o reactivos mencionados anteriormente de la presente invención que se pueden o no envasar conjuntamente. Los componentes del kit pueden estar comprendidos por viales separados (es decir, como un kit de partes separadas) o, en particular, los agentes de unión, provistos en un vial individual. Además, se debe entender que el kit de la presente invención se va a usar para llevar a la práctica los procedimientos mencionados en el presente documento anteriormente. Se contempla, en un modo de realización, que todos los componentes se proporcionen de manera lista para usar para llevar a la práctica los procedimientos mencionados anteriormente. Además, el kit, en un modo de realización, contiene instrucciones para llevar a cabo dichos procedimientos. Las instrucciones se pueden proporcionar por un manual del usuario en formato impreso o electrónico. Además, el manual puede comprender instrucciones para interpretar los resultados obtenidos cuando se llevan a cabo los procedimientos mencionados

anteriormente usando el kit de la presente invención. En un modo de realización, el kit comprende al menos dos compuestos de unión, en el que al menos un compuesto de unión es un compuesto de captura, y en el que al menos un compuesto de unión es un compuesto detector. En un modo de realización, al menos un compuesto de captura comprendido en el kit comprende un marcador de biotina. En otro modo de realización, al menos un compuesto detector comprendido en el kit comprende un marcador de rutenio. También en un modo de realización, el kit comprende además un medio de neutralización, por ejemplo, un tampón. En un modo de realización, el virus que se va a detectar es un virus sin envoltura, en otro modo de realización, un virus de la familia *Parvoviridae*, como se especifica en el presente documento anteriormente.

Además, la presente invención se refiere a un uso de una base para pretratar una muestra de un sujeto para su uso en un inmunoensayo para detectar un virus sin envoltura; y la invención se refiere a un uso de una base para detectar un virus sin envoltura en una muestra de un sujeto por medio de un inmunoensayo.

Además, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto de unión que se une específicamente al (i) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino o al (ii) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino, que comprende

a1) poner en contacto dicho compuesto de unión con un polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino,

a2) detectar la unión de dicho compuesto de unión a dicho polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino de la etapa a1),

b1) poner en contacto dicho compuesto de unión con un polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino y con un polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino,

b2) detectar la unión de dicho compuesto de unión a dicho polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino de la etapa b1),

c) comparar la unión de dicho compuesto de unión en la etapa a2) a la unión de dicho compuesto de unión en la etapa b2), e

d) identificar un compuesto de unión que se une específicamente al (i) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino o al (ii) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino en base a la comparación de la etapa c).

Además, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto de unión que se une específicamente al (i) polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino o al (ii) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino, que comprende

a1) poner en contacto dicho compuesto de unión con un polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino,

a2) detectar la unión de dicho compuesto de unión a dicho polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino de la etapa a1),

b1) poner en contacto dicho compuesto de unión con un polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino y con un polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino,

b2) detectar la unión de dicho compuesto de unión a dicho polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino de la etapa b1),

c) comparar la unión de dicho compuesto de unión en la etapa a2) a la unión de dicho compuesto de unión en la etapa b2), e

d) identificar un compuesto de unión que se une específicamente al (i) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino o al (ii) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino en base a la comparación de la etapa c).

Los procedimientos para identificar un compuesto de unión de la presente divulgación, en modos de realización, son procedimientos *in vitro*. Además, pueden comprender etapas además de las mencionadas de forma explícita anteriormente. Por ejemplo, las etapas adicionales se pueden referir, por ejemplo, a identificar inicialmente un compuesto de unión que se une a un polipéptido de la cápside; o a proporcionar un polipéptido de la cápside y un polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino. Además, una o más de dichas etapas se pueden realizar por un equipo automatizado.

En un modo de realización, el polipéptido de la cápside es un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura, en otro modo de realización, de un virus de la familia *Parvoviridae*, como se especifica en el presente documento

anteriormente. En consecuencia, en un modo de realización, detectar la unión de dicho compuesto de unión a un polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino y/o a un polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino se realiza esencialmente de acuerdo con la descripción en el presente documento anteriormente y en los ejemplos. Como se entenderá por el experto en la técnica, el procedimiento para identificar un compuesto de unión de la presente invención es esencialmente un ensayo de competencia, en el que un polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino compite en la unión a un compuesto de unión con un polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino. En consecuencia, el polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y sin tratamiento alcalino son, en un modo de realización, idénticos excepto por el tratamiento alcalino.

En consecuencia, en dicho procedimiento para identificar un compuesto de unión que se une específicamente al (i) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino o al (ii) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino, un compuesto de unión se identifica como que se une específicamente al polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino si la unión de dicho compuesto de unión en la etapa a2) no es significativamente diferente de la unión de dicho compuesto de unión en la etapa b2). Sin embargo, un compuesto de unión se identifica como que se une específicamente al polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino si la unión de dicho compuesto de unión en la etapa a2) es significativamente mayor que la unión de dicho compuesto de unión en la etapa b2). En otro modo de realización, la unión de dicho compuesto de unión se detecta poniendo en contacto complejos de polipéptido de la cápside/compuesto de unión potenciales con un compuesto que reconoce genéricamente la clase de compuestos de los que proviene dicho compuesto de unión, por ejemplo, un anticuerpo antimurino.

Correspondientemente, en dicho procedimiento para identificar un compuesto de unión que se une específicamente al (i) polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino o al (ii) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino, un compuesto de unión se identifica como que se une específicamente al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino si la unión de dicho compuesto de unión en la etapa a2) no es significativamente diferente de la unión de dicho compuesto de unión en la etapa b2). Sin embargo, un compuesto de unión se identifica como que se une específicamente al polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino si la unión de dicho compuesto de unión en la etapa a2) es significativamente mayor que la unión de dicho compuesto de unión en la etapa b2). En otro modo de realización, la unión de dicho compuesto de unión se detecta poniendo en contacto complejos de polipéptido de la cápside/compuesto de unión potenciales con un compuesto que reconoce genéricamente la clase de compuestos de los que proviene dicho compuesto de unión, por ejemplo, un anticuerpo antimurino.

Como se entenderá por el experto en la técnica a partir de lo anterior, ambos procedimientos para identificar un compuesto de unión son adecuados para identificar un compuesto de unión que se une tanto a un polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino como a uno sin tratamiento alcalino. Como también se entenderá por el experto en la técnica, en caso de que se identifique un compuesto de unión que se une al polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino, para lo que no se requiere saber si el polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino también está unido, las etapas b1) a c) se pueden omitir del procedimiento para identificar un compuesto de unión que se une específicamente al (i) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino o al (ii) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino como se especifica anteriormente. En consecuencia, la presente divulgación también se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto de unión que se une, en un modo de realización que se une específicamente, al polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino, que comprende

- a1) poner en contacto dicho compuesto de unión con un polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino,
- a2) detectar la unión de dicho compuesto de unión a dicho polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino de la etapa a1), e
- b) identificar un compuesto de unión que se une al polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino en base a la detección de la unión en la etapa a2).

Además, la presente invención también se refiere a un dispositivo analítico para detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura en una muestra, que comprende una unidad de análisis con una unidad de tratamiento de muestras, estando adaptada dicha unidad de análisis para hacer que se realicen las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto una muestra aplicada a dicha unidad de tratamiento de muestras con una base, y
- (b) detectar un polipéptido de la cápside de dicho virus en dicha muestra.

En un modo de realización, la unidad de tratamiento de muestras de la unidad de análisis está conectada a una unidad controladora, estando adaptada dicha unidad controladora para dirigir las etapas como se especifica anteriormente que se van a realizar.

El término "dispositivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de medios que comprenden al menos los medios mencionados anteriormente conectados funcionalmente entre sí para permitir que se obtenga el resultado de la detección. Los medios preferentes para poner en contacto una muestra con una base y para detectar un polipéptido de la cápside se divulgan anteriormente en relación con los procedimientos de la invención. La forma de conectar los medios de una manera operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. En un modo de realización, los medios están comprendidos por un único dispositivo.

En un modo de realización, la unidad de tratamiento de muestras comprende un receptáculo para una muestra. El receptáculo puede estar en contacto directamente con la muestra, o puede ser un receptáculo para un medio adicional que recibe la muestra, en el que el medio adicional puede ser, por ejemplo, una placa de múltiples pocillos, a la que se puede aplicar una muestra o una multiplicidad de muestras. Además, la unidad de tratamiento de muestras, en un modo de realización, comprende una base, por ejemplo, en forma seca o en un depósito conectado a un medio de dosificación, por ejemplo, un tubo conectado a una bomba. Opcionalmente, la unidad de tratamiento de muestras puede comprender un medio de neutralización para disminuir el pH en la muestra después de poner la muestra en contacto con dicha base. En un modo de realización, la unidad de tratamiento de muestras comprende al menos un compuesto detector, por ejemplo, en forma seca o en un depósito conectado a un medio de dosificación, por ejemplo, un tubo conectado a una bomba. En otro modo de realización, la unidad de tratamiento de muestras comprende medios para mezclar y medios para ajustar la temperatura de una mezcla de reacción.

En un modo de realización, el resultado de la detección se puede obtener mediante una inspección visual por el usuario o realizando una medición de detección en un dispositivo apropiado. En un modo de realización, la unidad de análisis del dispositivo de la presente invención comprende además una unidad de detección para detectar un polipéptido de la cápside de la presente invención, en un modo de realización para detectar la cantidad de un polipéptido de la cápside de la presente invención. Los medios adecuados como una unidad de detección de acuerdo con la presente invención son conocidos por el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, dispositivos fotométricos.

En un modo de realización, el dispositivo de la presente invención comprende además una unidad de salida de datos, conectada a la unidad de detección. La unidad de salida de datos, en un modo de realización, se adapta para emitir los datos obtenidos por la unidad de detección. Las unidades de salida de datos adecuadas son conocidas por el experto en la técnica e incluyen unidades de salida simples tales como una lámpara indicadora o una pantalla que indica que se detectó un polipéptido de la cápside por encima del umbral de detección. Sin embargo, una unidad de salida también puede ser una interfaz para un dispositivo de evaluación, en la que dicha interfaz puede ser cualquier tipo de medio de transferencia de datos, incluyendo, por ejemplo, conexiones por cable como USB, conexiones inalámbricas como LAN inalámbrica, bluetooth y similares, o conexiones indirectas tales como la transferencia de datos por mensajería instantánea, correo electrónico o similares.

En un modo de realización, el dispositivo de la presente invención es parte de un sistema analítico, comprendiendo dicho sistema analítico además un dispositivo de evaluación. Como se entenderá por el experto en la técnica, el dispositivo de evaluación puede estar comprendido en la misma carcasa que el dispositivo de la invención, por ejemplo, como una unidad de evaluación, o puede ser un dispositivo separado. En un modo de realización, el dispositivo de evaluación comprende un microprocesador programado para recibir datos de salida desde una unidad de salida del dispositivo de la presente invención y para realizar operaciones lógicas que proporcionan una evaluación de dichos datos de salida. La evaluación de los datos de salida puede comprender, por ejemplo, corregir datos para valores medidos en una o más reacciones de detección de control, cálculos estadísticos, por ejemplo, calcular medias de dos o más reacciones de detección en paralelo, corregir datos para factores de dilución, comparar datos de salida con valores de referencia, compilar datos en una lista y similares. En un modo de realización, el dispositivo de evaluación comprende además una unidad de almacenamiento de datos. En otro modo de realización, dicha unidad de almacenamiento de datos comprende valores de referencia, por ejemplo, en una base de datos de valores de referencia. Además, en un modo de realización, la unidad de almacenamiento de datos está adaptada para almacenar datos de salida recibidos desde un dispositivo de la presente invención, como se especifica anteriormente.

En un modo de realización, donde se aplican medios para detectar automáticamente un polipéptido de la cápside de dicho virus, los datos obtenidos mediante dichos medios de funcionamiento automático se pueden procesar, por ejemplo, mediante un programa informático para establecer un diagnóstico (es decir, identificar a un sujeto infectado con un virus sin envoltura). Los medios de detección típicos se divulgan en relación con modos de realización relacionados con los procedimientos de la invención anteriores. En dicho caso, los medios están conectados funcionalmente ya que el usuario del sistema reúne el resultado de la determinación de la cantidad y el valor diagnóstico de la misma debido a las instrucciones e interpretaciones dadas en un manual. El experto en la técnica se dará cuenta de cómo conectar los medios sin habilidades inventivas adicionales. Los dispositivos típicos son los que se pueden aplicar sin el conocimiento particular de un médico especialista, por ejemplo, tiras reactivas o dispositivos electrónicos que simplemente requieran la carga de una muestra. Los resultados se pueden dar como salida de datos brutos de diagnóstico paramétrico, preferentemente, como cantidades absolutas o relativas. Se debe entender que estos datos necesitarán la interpretación del médico. Sin embargo, también se contemplan dispositivos de sistemas expertos en los que la salida comprende datos brutos de diagnóstico procesado en los que su

interpretación no requiere un médico especializado. Otros modos de realización de dispositivos comprenden las unidades/dispositivos de análisis (por ejemplo, biosensores, matrices, soportes sólidos acoplados a ligandos que reconocen específicamente los polipéptidos, dispositivos de resonancia de plasmón superficial, espectrómetros de RMN, espectrómetros de masa, etc.) o las unidades/dispositivos de evaluación mencionados anteriormente de acuerdo con los procedimientos de la invención.

También se divulga un programa informático que incluye instrucciones ejecutables por ordenador para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención en uno o más de los modos de realización incluidos en el presente documento cuando el programa se ejecuta en un dispositivo analítico, ordenador o red informática. Específicamente, el programa informático se puede almacenar en una unidad de almacenamiento de datos legible por ordenador. Por tanto, específicamente, una, más de una o incluso todas las etapas de procedimiento como se indica anteriormente se pueden realizar usando un ordenador o una red informática, preferentemente usando un programa informático.

También se divulga aquí un producto de programa informático que tiene medios de código de programa, para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención en uno o más de los modos de realización incluidos en el presente documento cuando el programa se ejecuta en un dispositivo analítico, ordenador o red informática. Específicamente, los medios de código de programa se pueden almacenar en una unidad de almacenamiento de datos legible por ordenador.

También se divulga una unidad de almacenamiento de datos que tiene una estructura de datos almacenada en la misma, que, después de cargarla en un ordenador o una red informática, tal como en una memoria de trabajo o memoria principal del ordenador o red informática, puede ejecutar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento.

Aquí se divulga también un producto de programa informático con medios de código de programa almacenados en una unidad de almacenamiento legible por máquina, para realizar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento, cuando el programa se ejecuta en un ordenador o una red informática. Como se usa en el presente documento, un producto de programa informático se refiere al programa como un producto comercializable. El producto en general puede existir en un formato arbitrario, tal como en un formato impreso, o en una unidad de almacenamiento de datos legible por ordenador. Específicamente, el producto de programa informático se puede distribuir sobre una red de datos.

Finalmente, aquí se divulga una señal de datos modulada que contiene instrucciones legibles por un sistema informático o red informática, para realizar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento.

Preferentemente, en referencia a los aspectos implementados por ordenador de la presente divulgación, una o más de las etapas de procedimiento o incluso todas las etapas de procedimiento del procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento se pueden realizar usando un ordenador o una red informática. Por tanto, en general, cualquiera de las etapas de procedimiento, incluyendo la provisión y/o la manipulación de datos, se puede realizar usando un ordenador o una red informática. En general, estas etapas de procedimiento pueden incluir cualquiera de las etapas de procedimiento típicamente, excepto por las etapas de procedimiento que requieran trabajo manual, tales como proporcionar las muestras y/o determinados aspectos de realizar las mediciones reales.

Específicamente, aquí se divulgan:

- Un ordenador o una red informática que comprende al menos un procesador, en el que el procesador se adapta para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción,
- una estructura de datos que se puede cargar en el ordenador que se adapta para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción mientras se está ejecutando la estructura de datos en un ordenador,
- un programa informático, en el que el programa informático se adapta para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción mientras se está ejecutando el programa en un ordenador,
- un programa informático que comprende medios de programa para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción mientras se está ejecutando el programa informático en un ordenador o en una red informática,
- un programa informático que comprende medios de programa de acuerdo con el modo de realización precedente, en el que los medios de programa se almacenan en un medio de almacenamiento legible para un ordenador,

- un medio de almacenamiento, en el que una estructura de datos se almacena en el medio de almacenamiento y en el que la estructura de datos se adapta para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción después de haberse cargado en un almacenamiento principal y/o de trabajo de un ordenador o de una red informática, y

- un producto de programa informático que tiene medios de código de programa, en el que los medios de código de programa se pueden almacenar o se almacenan en un medio de almacenamiento, para realizar el procedimiento de acuerdo con uno o los modos de realización descritos en esta descripción, si los medios de código de programa se ejecutan en un ordenador o en una red informática.

Además, la presente invención se refiere al uso de una base para la fabricación de un dispositivo, kit o composición para diagnosticar una infección de un sujeto con un virus sin envoltura.

Breve descripción de las figuras

Otros rasgos característicos y modos de realización opcionales de la invención se divulgarán con más detalle en la posterior descripción de los modos de realización preferentes, preferentemente junto con las reivindicaciones dependientes. En las mismas, los rasgos característicos opcionales respectivos se pueden lograr de forma aislada así como en cualquier combinación factible arbitraria, como se dará cuenta el experto en la técnica. El alcance de la invención no está restringido por los modos de realización preferentes. Los aspectos de los modos de realización se representan esquemáticamente en la figura.

En la figura:

Figura 1 muestra el principio del cribado de anticuerpos que reconocen (i) los polipéptidos de la cápside con tratamiento alcalino o (ii) los polipéptidos de la cápside con tratamiento alcalino y las partículas similares a virus biotiniladas de polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino. A) precibado; B) después del precibado, unión de anticuerpos que reconocen el polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y el polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino; C) unión de anticuerpos que reconocen solo el polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino. (1): partículas similares a virus biotiniladas, (3): anticuerpo de detección antimurino rutenilado, (2): anticuerpos candidatos (compuestos de unión), (4) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino.

Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Generación de anticuerpos monoclonales anticápside del parvovirus B19

##### **a) Inmunización de ratones**

Los ratones NMRI se inmunizaron inicialmente por vía intraperitoneal con 100 µg de partículas similares a virus (VLP) de B19 recombinantes (Diarect, Freiburg, Alemania) formuladas con CFA (adyuvante completo de Freund). Las VLP de B19 recombinantes usadas para la inmunización estaban compuestas por las proteínas VLP1 y VLP2 de la cápside de B19. Dos etapas de inmunización intraperitoneal adicionales siguieron después de 6 y 10 semanas, con aplicación de 100 µg de VLP de B19 por ratón mezcladas con IFA (adyuvante incompleto de Freund). Posteriormente, los ratones se reforzaron mediante la administración i.v. de 50 µg de VLP de B19 tres y dos días antes de que los animales se sacrificaran y se aislaron células del bazo y se usaron para la fusión.

##### **b) Fusión y clonación**

La fusión de las células del bazo con células de mieloma se realizó mediante procedimientos estándar usando polietilenglicol. En resumen, se mezclaron aproximadamente  $1 \times 10^8$  esplenocitos con aproximadamente  $2 \times 10^7$  células de mieloma (P3x63-Ag8.653) en RPMI-1640 y se centrifugaron (10 min, 250 x g). Se lavaron las células una vez con RPMI-1640 y se centrifugaron de nuevo. Después de esto, se añadió 1 ml de PEG (polietilenglicol) al sedimento celular y se mezcló mediante pipeteo. Después de 1 min en un baño de agua a 37 °C, se añadieron gota a gota 5 ml de RPMI-1640, se mezcló la suspensión, se llenó hasta 30 ml con RPMI-1640 y se centrifugó (10 min, 180 x g). Se resuspendieron las células en medio de selección (RPMI-1640 complementado con 10 % de FCS, 100 U/ml de IL-6, L-glutamina 2 mM, NEAA 100 µM, piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoetanol 24 µM, 1x azaserina/hipoxantina (Sigma-Aldrich)). Después de 24 horas de cultivo a 37 °C, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Después de aproximadamente 10 días, los cultivos primarios se sometieron a ensayo para determinar la producción de anticuerpos específicos (como se describe a continuación). Los cultivos primarios seleccionados se clonaron por separación de células sueltas usando un citómetro de flujo (FACS Aria, BD Biosciences). Los clones de células se cultivaron en RPMI-1640 complementado con 10 % de FCS, 50 U/ml de IL-6, L-glutamina 2 mM, NEAA 100 µM, piruvato de sodio 1 mM y 2-mercaptoetanol 24 µM. Las líneas celulares de

hibridoma monoclonal establecidas se volvieron a someter a prueba para determinar la especificidad como se describe a continuación.

**c) Cribado para determinar la unión de anticuerpos a las VLP de B19 (ELISA)**

5 Para la determinación de la especificidad de los anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma, las placas de 96 pocillos previamente recubiertas con estreptavidina recombinante (MicroCoat, Bernried, Alemania) se recubrieron con 300 ng/ml de VLP de B19 biotiniladas durante 1 h a temperatura ambiente (TA).  
 10 Posteriormente, las placas se lavaron con NaCl al 0,9 %/Tween-20® al 0,05 %. Después del lavado, se añadieron 100 µl/pocillo de la solución de anticuerpo que se iba a someter a ensayo (sobrenadantes de cultivo) y se incubó durante 1 h a TA. Después de lavar con NaCl al 0,9 %/Tween-20® al 0,05 %, se añadieron 100 µl/pocillo de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> marcado con peroxidasa de rábano picante de un anticuerpo policlonal de Fcγ antimurino de oveja (100 ng/ml) para la detección de anticuerpo de muestra unido. Después de la incubación durante 1 h a TA, las  
 15 placas se lavaron como se describe anteriormente. Finalmente, se añadieron 100 µl/pocillo de ABTS® (Roche). Después de 30 min de incubación a TA se midió la extinción a 405 nm y a 492 nm.

Este cribado dio lugar a una selección de anticuerpos que se unen a las VLP de B19 en ELISA. Esta selección de anticuerpos se caracterizó adicionalmente en el ensayo descrito a continuación.

**d) Cribado para detectar la unión de anticuerpos a las VLP de B19 (Elecsys)**

La incubación de la muestra en condiciones alcalinas da como resultado una disociación de las cápsidas víricas y al menos un despliegue parcial de las proteínas de la cápsida. Por lo tanto, los anticuerpos adecuados para el ensayo preferentemente se dirigen contra epítomos lineales y no estructurales del antígeno (véase la fig. 1A). En una primera  
 25 ronda, se usó un ensayo de cribado de anticuerpos que incluía partículas similares a virus biotiniladas (1) y un anticuerpo de detección antimurino rutenilado (3) para cribar para detectar anticuerpos candidatos (2).

En una segunda ronda, se sometieron a prueba los candidatos adecuados para determinar su capacidad para detectar partículas similares a virus que se preincubaron en condiciones alcalinas (4) (fig. 1B y C). En estos  
 30 experimentos, las partículas similares a virus pretratadas con NaOH o HCl libres compiten con las partículas similares a virus no tratadas biotiniladas que se unen a la fase sólida. Los anticuerpos que son adecuados para el diseño del ensayo se deben unir a ambos antígenos dando como resultado una señal disminuida (fig. 1B), mientras que los anticuerpos específicos de la conformación no se deben ver afectados (fig. 1C).

35 Tabla 1: Selección de anticuerpos monoclonales anticápside del parvovirus B19 adecuados

grado de reducción de la señal por la presencia de VLP libres (pretratadas o naturales)						
		HCl	NaOH			Control
Anticuerpo	VLP natural	0,02M	1,4 M	1,0 M	0,6 M	sin VLP
2.053	100 %	97 %	57 %	45 %	102 %	0 %
2.061	100 %	99 %	96 %	-	-	0 %
2.068	100 %	100 %	102 %	-	-	0 %
2.073	100 %	97 %	42 %	48 %	98 %	0 %
2.077	100 %	97 %	21 %	27 %	96 %	0 %
2.081	100 %	103 %	104 %	110 %	108 %	0 %
2.106	100 %	99 %	102 %	-	-	0 %
2.111	100 %	99 %	81 %	-	-	0 %
2.127	100 %	100 %	86 %	102 %	112 %	0 %
MAK8292	100 %	-	21 %	58 %	93 %	0 %

En cuanto a la tabla 1, si las VLP naturales compiten eficazmente con las VLP unidas a la fase sólida para unirse al anticuerpo que se va a investigar, entonces el resultado para la reducción de la señal se establece en un 100 % de  
 40 "reducción de la señal". Al observar el anticuerpo 2.053, se puede ver que las VLP naturales reemplazan completamente a las VLP unidas a la fase sólida (reducción de la señal de un 100 %). Por otro lado, cuando las VLP desnaturalizadas (tratadas con NaOH 1,4 M) compiten con las VLP unidas a la fase sólida naturales por la unión al anticuerpo 2.053, la señal se reduce a solo un 57 %. Esto significa que para este anticuerpo, las VLP desnaturalizadas no compiten completamente con las VLP naturales. En otras palabras, el anticuerpo 2.053 no  
 45 reconoce eficazmente las VLP desnaturalizadas o reconoce las VLP desnaturalizadas solo en menor medida y, por lo tanto, es menos adecuado como componente de unión en un ensayo de detección de antígeno vírico después del pretratamiento con NaOH. Por el contrario, por ejemplo, el anticuerpo 2.061 se une a ambas variantes de VLP de una manera eficaz porque las VLP desnaturalizadas con NaOH pueden competir completamente (100 %) con la VLP natural por la unión al anticuerpo 2.061.

A partir de estos resultados, los anticuerpos 2.061, 2.068, 2.081 y 2.106 (y en menor medida 2.111 y 2.127) se identificaron como anticuerpos que se unen a (i) polipéptidos de la cápside con tratamiento alcalino o a (ii) polipéptidos de la cápside con tratamiento alcalino y polipéptidos de la cápside sin tratamiento alcalino.

#### 5 e) Producción a escala media de anticuerpos monoclonales anti-B19 seleccionados

Los mAb seleccionados se produjeron mediante la siembra del hibridoma correspondiente en biorreactores CellLine (Integra). La producción se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante de los biorreactores.

#### 10 Ejemplo 2

##### Acoplamiento de restos de biotina y rutenio a los anticuerpos monoclonales

15 El sobrenadante de cultivo celular de los clones seleccionados se purificó siguiendo un procedimiento de cromatografía de tres etapas: en primer lugar, una cromatografía de afinidad a la proteína A, a continuación una cromatografía de intercambio iónico y finalmente una cromatografía de afinidad negativa para eliminar pequeñas cantidades de IgG bovina, de forma alternativa, se realizó una etapa de pulido aplicando una cromatografía de exclusión por tamaño.

20 Los grupos  $\epsilon$ -amino de lisina de los polipéptidos de fusión se modificaron en concentraciones de proteínas de 5-30 mg/ml con moléculas marcadoras de biotina y rutenio activados con N-hidroxi-succinimida, respectivamente. La proporción marcador/proteína varió de 2:1 a 10:1 (mol:mol), dependiendo del anticuerpo respectivo. El tampón de reacción fue fosfato de potasio 50 mM, pH 8,4, KCl 150 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 min y se detuvo añadiendo L-lisina tamponada hasta una concentración final de 10 mM. Para evitar la inactivación hidrolítica de los marcadores, las soluciones madre respectivas se prepararon en DMSO seco (Sigma-Aldrich, Alemania). Las concentraciones de DMSO de hasta un 5 % en el tampón de reacción fueron bien toleradas por todas las proteínas de fusión estudiadas. Después de la reacción de acoplamiento, se eliminó el marcador libre sin reaccionar pasando el conjugado de proteína bruta sobre una columna de filtración en gel (por ejemplo: Superdex 200 HiLoad).

#### 30 Ejemplo 3

##### Incremento de la sensibilidad de un ensayo de detección de parvovirus B19 por medio de pretratamiento alcalino

35 La sensibilidad del ensayo de parvovirus B19 se evaluó en los analizadores automatizados Elecsys® 2010 y cobas e 411 (Roche Diagnostics GmbH). Elecsys® es una marca registrada del grupo Roche. Las mediciones se llevaron a cabo en el formato de tipo sándwich de doble anticuerpo con una preincubación de la muestra.

40 La detección de la señal en Elecsys® 2010 y cobas e 411 se basa en la electroquimioluminiscencia. El conjugado de biotina (es decir, el anticuerpo de captura) se inmoviliza en la superficie de una microesfera magnética recubierta de estreptavidina, mientras que el anticuerpo de detección tiene un catión de rutenio complejado (cambiando entre los estados de redox de 2+ y 3+) como resto de señalización. En presencia de un analito específico, el complejo cromógeno de rutenio se une mediante un puente a la fase sólida y emite luz a 620 nm después de su excitación en un electrodo de platino. La salida de señal está en unidades de luz relativas.

45 El efecto de una preincubación de muestra con pH variable se evaluó mediante un pretratamiento de dos componentes. El componente 1 (PT1) contiene HCl o NaOH en diferentes concentraciones o NaCl isotónico como control y el componente 2 (PT2) contiene detergente y agente reductor. El último no se varía. Después de 9 min de preincubación, se añadieron el tampón reactivo (Hepes 200 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, metilistiazolinona al 0,01 %, Tween20 al 0,20 %, seroalbúmina bovina al 0,30 %, pH 6,8) y anticuerpos biotinilados y rutenilados. La preincubación en condiciones alcalinas (reactivo 3 a 5) dio como resultado un incremento de la señal en comparación con el experimento de control (reactivo 1) que es comparable o superior al pretratamiento ácido en las muestras reactivas (n.º 2-7). Además, las señales de muestra interferente de entrecruzamiento inespecíficas (n.º 8) se reducen al fondo (muestra n.º 1) en el reactivo 3 a 5, mientras que la preincubación ácida no disminuye la señal de una interacción inespecífica. El efecto positivo de la preincubación alcalina es visible para pH > 10,5 (reactivo 3-5), mientras que un menor pH de preincubación (reactivo 6) no da como resultado un incremento de la señal ni la supresión de la señal inespecífica.

Tabla 2: Incremento de la sensibilidad de un ensayo de detección de parvovirus B19 por medio de pretratamiento alcalino

ID de muestra	Dilución	Medio de dilución	Reactivo 1		Reactivo 2		Reactivo 3	
			señal [cts]	proporción muestra/fondo	señal [cts]	proporción muestra/fondo	señal [cts]	proporción muestra/fondo
R241089*	-	-	1.295	1,0	1.315	1,0	1.249	1,0
TR69131701491	1:500	R237163	1.263	1,0	38.190	29,0	35.866	28,7
TR73091822517	1:1.000	C158001	2.619	2,0	17.435	13,3	15.374	12,3
Preparación de VLP VP2 ~ 2 mg/ml	1:10.000	R241089	2.947	2,3	98.113	74,6	157.445	126,1
	1:100.000	R241089	1.471	1,1	9.947	7,6	13.542	10,8
	1:1.000.000	R241089	1.371	1,1	2.218	1,7	2.347	1,9
	1:10.000.000	R241089	1.319	1,0	1.366	1,0	1.316	1,1
C158014	-	-	25.115	19,4	17.318	13,2	1.205	1,0
Pretratamiento (frasco PT1)			NaCl (150 mM)		HCl (0,2 M)		NaOH (1 M)	
Pretratamiento (frasco PT2)					DTT al 0,03 %; Tween al 2 %			
pH durante el pretratamiento			8,2		3,5		13,2	
pH durante la detección			6,9		6,2		9,0	

\* muestra negativa, definida como fondo para el cálculo de señal con respecto a fondo

Tabla 2 (continuación)

ID de muestra	Dilución	Medio de dilución	Reactivo 4		Reactivo 5		Reactivo 6	
			señal [cts]	proporción muestra/fondo	señal [cts]	proporción muestra/fondo	señal [cts]	proporción muestra/fondo
R241089*	-	-	1.132	1,0	1.219	1,0	1.268	1,0
TR69131701491	1:500	R237163	74.273	65,6	4.946	4,1	1.237	1,0
TR73091822517	1:1.000	C158001	33.629	29,7	4.251	3,5	2.393	1,9
Preparación de VLP VP2 ~ 2 mg/ml	1:10.000	R241089	202.585	179,0	3.659	3,0	2.768	2,2
	1:100.000	R241089	18.220	16,1	1.530	1,3	1.414	1,1
	1:1.000.000	R241089	2.705	2,4	1.281	1,1	1.308	1,0
	1:10.000.000	R241089	1.280	1,1	1.190	1,0	1.254	1,0
C158014	-	-	1.458	1,3	21.314	17,5	23.208	18,3
Pretratamiento (frasco PT1)			NaOH (0,2 M)		NaOH (0,1 M)		NaOH (0,05 M)	
Pretratamiento (frasco PT2)					DTT al 0,03 %; Tween al 2 %			
pH durante el pretratamiento			11,8		10,6		9,8	
pH durante la detección			7,2		7,0		6,9	

\* muestra negativa, definida como fondo para el cálculo de señal con respecto a fondo

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura en una muestra de un sujeto que comprende
  - (a) poner en contacto dicha muestra con una base, y
  - (b) detectar un polipéptido de la cápside de dicho virus en dicha muestra.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha detección de un polipéptido de la cápside comprende capturar al menos un polipéptido de la cápside en una superficie sólida por medio de un compuesto de captura.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho procedimiento comprende además poner en contacto dicho polipéptido de la cápside con un compuesto detector.
4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que dicho compuesto de captura y/o compuesto detector es un compuesto de unión que se une específicamente al (i) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino o al (ii) polipéptido de la cápside con tratamiento alcalino y al polipéptido de la cápside sin tratamiento alcalino.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha detección de dicho virus comprende detectar dicho virus en un inmunoensayo de tipo sándwich.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha muestra es una muestra de heces o una muestra de un líquido corporal.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha base es hidróxido de sodio o hidróxido de potasio.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho contacto de dicha muestra con una base comprende incubar dicha muestra a un pH de al menos 10,5.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho contacto de dicha muestra con una base comprende incubar dicha muestra en presencia de dicha base durante al menos 2 minutos.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha detección de un polipéptido de la cápside comprende detectar al menos uno de los polipéptidos de la cápside vírica VP1, VP2 y VP3.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho virus sin envoltura es un virus de la familia *Parvoviridae*, en un modo de realización, es el *Primate erythroparvovirus 1* (parvovirus B19).
12. Un procedimiento para preprocesar una muestra de un sujeto para la detección de un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura, que comprende poner en contacto dicha muestra con una base.
13. Un kit para detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura en una muestra, que comprende una base y al menos un compuesto de unión que se une específicamente a un polipéptido de la cápside de dicho virus.
14. Uso de una base para pretratar una muestra de un sujeto para su uso en un inmunoensayo para detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura; o para detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura en una muestra de un sujeto por medio de un inmunoensayo.
15. Un dispositivo analítico para detectar un polipéptido de la cápside de un virus sin envoltura en una muestra, que comprende una unidad de análisis con una unidad de tratamiento de muestras, estando adaptada dicha unidad de análisis para hacer que se realicen las siguientes etapas:
  - (a) poner en contacto una muestra aplicada a dicha unidad de tratamiento de muestras con una base, y
  - (b) detectar un polipéptido de la cápside de dicho virus en dicha muestra.

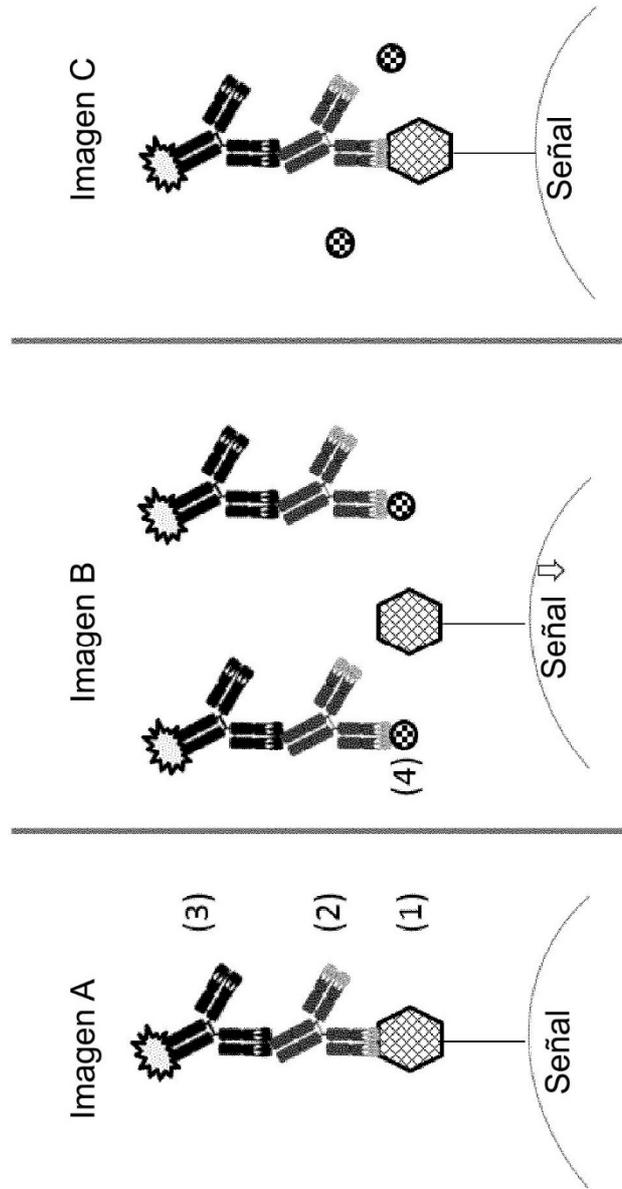


Fig. 1