



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 279 766**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00952184 .0**

(86) Fecha de presentación : **25.07.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1295126**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

(54) Título: **Sistemas de detección por inmunoensayos del antígeno viral de hepatitis C.**

(30) Prioridad: **28.07.1999 US 146079 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

(73) Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

(72) Inventor/es: **Chien, David Y. y**
Arcangel, Phillip

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Sistemas de detección por inmunoensayos del antígeno viral de hepatitis C.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a inmunoensayos para detectar el virus de la hepatitis C y específicamente a métodos para detectar el virus de la hepatitis C en muestras biológicas, a métodos para escrutar productos sanguíneos en cuanto al virus de la hepatitis C, y a kits para ello.

10 **Antecedentes de la invención**

El virus de la hepatitis C (HCV) fue identificado primero y caracterizado como la causa primaria de la hepatitis no A, no B post-transfusión (NANBH) por Houghton, *et al.* Además de proporcionar una información sustancial concerniente al HCV, Houghton, *et al.*, y sus colaboradores han descrito numerosos reactivos y métodos inmunológicos generales y específicos. Véase, p. ej., Houghton, *et al.*, Pub. EPO Núm. 318216; Houghton, *et al.*, Pub. EPO Núm. 388232; Choo, *et al.*, Science, **1989**, 244, 359-362; Kuo, *et al.*, Science, **1989**, 244, 362-364; Takeuchi, *et al.*, J. Gen. Virol., **1990**, 71: 3027-3033; Takeuchi, *et al.*, Gene, **1990**, 91, 287-291; Takeuchi, *et al.*, Nucl. Acids Res., **1990**, 18, 4626; Miyamura, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1990**, 87, 983-987; Saito, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1990**, 87, 6547-6549; Choo, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1991**, 88, 2451-2455; Han, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 1711-1715; Houghton, *et al.*, Hepatology, **1991**, 14, 381-388; y Weiner, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1992**, 89, 3468-3472. Estas publicaciones proporcionan a la técnica extensos antecedentes sobre el HCV en general, así como la fabricación y los usos de los reactivos inmunológicos polipeptídicos para el HCV.

Otros han aplicado y ampliado rápidamente el trabajo de Houghton, *et al.* Véase, p. ej., Highfield, *et al.*, Solicitud de Patente del Reino Unido 2.239.245 (The Wellcome Foundation Ltd.); Wang, Pub. EPO Núm. 442.394 (United Biomedical Inc.); Leung, *et al.*, Pub. EPO Núm. 445.423 (Abbott Laboratories); Habits, *et al.*, Pub. EPO Núm. 451.891 (Akzo N.V.); Reyes, *et al.*, Pub. PCT Núm. WO 91/15516 (Genelabs Inc.); Maki, *et al.*, Pub. EPO Núm. 468.657 (Tonon Corp.); y Kamada, *et al.*, Pub. EPO Núm. 469.348 (Shionogi Seiyaku K.K.). Véase también, Matsuura, *et al.*, J. Virology, **1992**, 66, 1425; Kato, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1990**, 87, 9524-9528; Takamizawa, *et al.*, J. Virol., **1991**, 65, 1105-1113; Chiba, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1991**, 88, 4641-4645; Harada, *et al.*, J. Virol., **1990**, 65, 3015-3021; Hijikata, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1991**, 88, 5547-5551; Okamoto, *et al.*, Jpn. J. Exp. Med., **1990**, 60, 167-177; Yuasa, *et al.*, J. Gen. Virol., **1991**, 72, 2021-2024; y Watanabe, *et al.*, Int. J. Cancer, **1991**, 48, 340-343.

Los métodos específicos y sensibles para escrutar e identificar a los portadores de HCV y sangre o productos sanguíneos contaminados con HCV, así como vigilar de pacientes que experimentan tratamiento, son importantes avances en medicina. La hepatitis post-transfusión (PTH) se produce en aproximadamente un 10% de los pacientes sometidos a transfusión, y el HCV es responsable representa hasta el 90% de estos casos. El principal problema de esta enfermedad es el frecuente progreso a una lesión hepática crónica (25-55%) con respecto a otras hepatitis, tales como el tipo B.

El cuidado del paciente así como la prevención de la transmisión del HCV por medio de la sangre y los productos sanguíneos o por el contacto personal íntimo requieren herramientas de diagnóstico y pronóstico fiables tales como, por ejemplo, anticuerpos contra HCV, para detectar proteínas relacionadas con la infección por HCV. Tales anticuerpos también son útiles como agentes para vigilar los regímenes de tratamiento para pacientes con HCV. Puesto que el HCV es un agente relativamente nuevo, existe una necesidad continua de definir reactivos inmunológicos adicionales que permitan estudiar adicionalmente el curso clínico de la enfermedad y la epidemiología del HCV en la población.

La metodología actual para detectar HCV se centra en la detección de anticuerpos específicos de HCV. Véase, por ejemplo, Hada, *et al.*, Acta Med. Okayama, **1992**, 46, 365-70; Miyamura, *et al.*, Pub. EPO Núm. 0537626; Lok, *et al.*, Hepatology, **1993**, 18, 497-502; Wang, *et al.*, Vox Sang, **1992**, 62, 21-4; Kleinman, *et al.*, Transfusion, **1992**, 32, 805-813; Leon, *et al.*, Vox Sang, **1996**, 70, 213-16; Lesniewski, *et al.*, J. Med. Virol., **1995**, 45, 415-22; e Inoue, *et al.*, J. Gen. Virol., **1992**, 73, 2151-54. Una desventaja importante para detectar anticuerpos que reaccionan con HCV es que la seroconversión ya se ha producido y el paciente ya puede tener una infección viral bien establecida. Alternativamente, si se determina que un individuo es reactivo a anticuerpos de HCV, esto puede significar simplemente que el individuo ha estado expuesto al HCV alguna vez en el pasado y puede no estar infectado en la actualidad.

Otros métodos para detectar el HCV comprenden utilizar la PCR. Véase, por ejemplo, Francois, *et al.*, J. Clin. Microbiol., **1993**, 31, 1189-93. También se han detectado las proteínas de la envuelta de HCV mediante ensayo inmunohistoquímico de los hepatocitos en pacientes con una enfermedad del hígado crónica. No obstante, estos ensayos no se prestan fácilmente a un entorno clínico. Hiramatsu, *et al.*, Hepatology, **1992**, 16, 306-311.

Otros métodos también están dirigidos a detectar la proteína núcleo del HCV. Ver, por ejemplo, Orito, *et al.*, Gut, **1996**, 39, 876-80 y Kashiwakuma, *et al.*, J. Immunol. Methods, **1996**, 190, 79-89. Estos métodos incluyen un inmunoensayo fluoroenzimático de captura de proteínas (FEIA), un ensayo ELISA sándwich tradicional, utilizando anticuerpos monoclonales reactivos con la proteína núcleo de HCV recombinante. El método consiste en la utilización de un anticuerpo monoclonal aplicado como recubrimiento sobre una fase sólida como anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal conjugado con beta-D-galactosidasa como anticuerpo señal para la detección del antígeno.

Estos ensayos, no obstante, requieren procedimientos de preparación de la muestra muy tediosos incluyendo, por ejemplo, precipitación con polietilenglicol, desnaturalización con NaOH, re-titulación de la muestra a pH neutro y adición de Triton X-100 a la preparación de la muestra antes de iniciar el ensayo. Tales ensayos no son convenientes en el entorno clínico. Por supuesto, lo que se requiere es un inmunoensayo rápido, fácil para la detección de antígenos de HCV.

En WO 9304105 se describe un método para la detección de antígenos del virus de la hepatitis C (HCV) que comprende anclar directamente un anticuerpo anti-envuelta de HCV de conejo (mono- o policlonal) sobre una fase sólida, poner en contacto los anticuerpos inmovilizados con la muestra y detectar el antígeno de HCV capturado utilizando anticuerpos anti-envuelta de HCV marcados. WO9304205 hace referencia a la detección de complejos entre el antígeno de HCV y los anticuerpos para HCV utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos antigénicos no reconocidos por el individuo infectado.

En WO9213892 se describe la detección de antígenos que implica un ensayo sándwich en el que se utilizan dos anticuerpos anti-envuelta de HCV monoclonales. Este ensayo no permitirá la detección de complejos anticuerpo-antígeno. En US4464474 se describe un ensayo similar para la detección de antígenos de HCV en un formato sándwich utilizando dos anticuerpos anti-HCV.

En WO9740176 se describen anticuerpos anti-envuelta de HCV humanos, marcados, y su uso en la detección de antígeno de HCV.

Ninguno de estos documentos describe la detección simultánea del antígeno de la envuelta del virus de la hepatitis C libre y los complejos inmunitarios del virus de la hepatitis C y los anticuerpos anti-virus de la hepatitis C humanos en la muestra. Esta detección simultánea se posibilita mediante el uso de un anticuerpo policlonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C unido a un anticuerpo anti-humano que está anclado a una fase sólida. Un anticuerpo monoclonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C marcado permite detectar después la presencia de proteínas de la envuelta de HCV libres así como los complejos entre el antígeno de HCV y los anticuerpos anti-HCV humanos en una muestra.

Los solicitantes han desarrollado un sistema de inmunoensayo que puede detectar antígenos de la envuelta de HCV, E1 y E2, sin procedimientos tediosos de preparación de la muestra. El método proporciona un medio para detectar antígenos de HCV libres antes de la seroconversión, la desaparición del antígeno después de una infección aguda, y/o la terapia con interferón y, de este modo, es útil como diagnóstico y escrutinio de sangre y evaluación de la eficacia del tratamiento con fármacos. Así, la invención de los Solicitantes representa una mejora significativa para detectar HCV en muestras biológicas.

Compendio de la invención

La presente invención está dirigida a métodos para detectar el virus de la hepatitis C en una muestra biológica, que comprenden poner en contacto un anticuerpo anti-humano anclado a una fase sólida con un anticuerpo policlonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C, poner en contacto la muestra con el anticuerpo policlonal, poner en contacto la muestra al menos con un anticuerpo monoclonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C, marcado detectablemente, en condiciones que permiten una reacción inmunológica entre los anticuerpos y la muestra, y detectar la presencia de complejos inmunitarios de los anticuerpos y la proteína de la envuelta y/o la presencia de proteína de la envuelta libre.

La presente invención también está dirigida a métodos de escrutinio de componentes de la sangre o sangre en cuanto al virus de la hepatitis C antes del uso de semejante sangre o componentes de la sangre para preparar productos sanguíneos, que comprenden hacer reaccionar un componente corporal de un donante potencial con un anticuerpo anti-humano anclado a una fase sólida con un anticuerpo policlonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C, y al menos un anticuerpo monoclonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C en condiciones que permiten una reacción inmunológica entre los anticuerpos y el componente corporal, detectar la presencia de complejos inmunitarios formados entre los anticuerpos y las proteínas de la envuelta del virus de la hepatitis C, y descartar cualquier sangre o componente de la sangre del donante si se detectan los complejos.

La presente invención también está dirigida a kits para detectar el virus de la hepatitis C en una muestra biológica, que comprenden un anticuerpo anti-humano anclado a una fase sólida; al menos un anticuerpo monoclonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C, marcado detectablemente; un anticuerpo policlonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C; patrones de control e instrucciones para el uso de los componentes del kit.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A, 1B, 1C representan configuraciones de ensayo. La Figura 1D muestra los componentes preferidos de las Figuras 1A, 1B, y 1C.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el régimen de tratamiento de un paciente que tiene HCV.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En la práctica de la presente invención se emplearán, a menos que se indique de otro modo, métodos convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y tecnología de ADN recombinante conocidos por el experto en la técnica. Véase, p. ej., Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 2ª Ed., 1989; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I y II, D. Glover, Ed., *Methods In Enzymology*, S. Colowick and N. Kaplan, Eds., Academic Press Inc.; *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV, D.M. Weir and C.C. Blackwell, Eds., Blackwell Scientific Publications; y *Fundamental Virology*, 2ª Ed., Vols. I y II, B.N. Fields y D.M. Knipe, Eds. Además, los anticuerpos se preparan siguiendo los protocolos publicados normalizados mostrados, por ejemplo, por Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

La “proteína de la envuelta de HCV” hace referencia a un polipéptido o análogo de polipéptido (p. ej., “mimitopos”) que comprende una secuencia de aminoácidos (y/o análogos de aminoácidos) que define al menos un epítipo de HCV en una proteína de la envuelta. Típicamente, las secuencias que definen el epítipo corresponden a la secuencia de aminoácidos de una proteína de HCV (ya sea idénticamente o por medio de la sustitución de análogos de restos aminoácidos nativos que no destruya el epítipo). En general, la secuencia que define el epítipo tendrá 5 o más aminoácidos de longitud, más típicamente 8 o más aminoácidos de longitud, e incluso más típicamente 10 o más aminoácidos de longitud.

“Epítipo lineal” hace referencia a una porción de una proteína de la envuelta que comprende una serie de aminoácidos contiguos. La porción de unión al anticuerpo interacciona preferiblemente con un epítipo definido por 5 o más aminoácidos contiguos, más típicamente 8 o más aminoácidos contiguos, e incluso más típicamente 10 o más aminoácidos contiguos.

“Epítipo neutralizador lineal” hace referencia a un epítipo lineal de manera que cuando un anticuerpo se une al epítipo, los anticuerpos bloquean la infección viral de la célula diana. Los anticuerpos reactivos con estos epítipos dentro de la proteína de la envuelta son capaces de inhibir o abrogar la infección viral de las células diana.

“Epítipo conformacional” hace referencia a los epítipos formados por la conformación tridimensional del antígeno (p. ej., plegamiento). La longitud de la secuencia que define el epítipo puede estar sometida a amplias variaciones. De este modo, los aminoácidos que definen el epítipo pueden ser pocos relativamente, pero ampliamente dispersos a lo largo de la molécula (o incluso en diferentes moléculas en el caso de los dímeros, etc.), ocasionando la conformación correcta del epítipo por medio del plegamiento. Las porciones del antígeno entre los restos que definen el epítipo pueden no ser críticas para la estructura conformacional del epítipo. Por ejemplo, la delección o sustitución de estas secuencias intermedias puede no afectar al epítipo conformacional siempre que las secuencias críticas para la conformación del epítipo se mantengan (p. ej., cisteínas implicadas en enlaces disulfuro, sitios de glicosilación, etc.).

“E1” según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una proteína o polipéptido expresados en los 400 primeros aminoácidos de una poliproteína de HCV, a veces referida como proteína E o S. En su forma nativo es una glicoproteína de 35 kD que se encuentra en fuerte asociación con la membrana. En las mayoría de las cepas de HCV nativos, la proteína E1 está codificada en la poliproteína viral siguiente a la proteína C (núcleo). La proteína E1 se extiende desde aproximadamente el aminoácido (aa) 192 a aproximadamente el aa 383 de la poliproteína completa. El término “E1” según se utiliza en la presente memoria también incluye análogos y formas truncadas que presentan reacción cruzada inmunológica con la E1 nativo.

“E2” según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una proteína o polipéptido expresados en los 900 primeros aminoácidos de una poliproteína de HCV, a veces referida como proteína NS1. En su forma nativo es una glicoproteína de 72 kD que se encuentra en fuerte asociación con la membrana. En la mayoría de las cepas de HCV nativos, la proteína E2 está codificada en la poliproteína viral siguiente a la proteína E1. La proteína E2 se extiende desde aproximadamente el aa 384 a aproximadamente el aa 820. El término “E2” según se utiliza en la presente memoria también incluye análogos y formas truncadas que presentan reacción cruzada inmunológica con la E2 nativo.

El término “agregado” según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un complejo de E1 y/o E2 que contiene más de un monómero de E1 o E2. Los dímeros E1:E1, los dímeros E2:E2, y los heterodímeros E1:E2 son todos “agregados” dentro del alcance de esta definición. Los agregados también pueden incluir formas más grandes, y pueden tener pesos moleculares por encima de 800 kD.

La frase “muestra biológica” hace referencia a un fluido o tejido de un mamífero (p. ej., un antropoide, un ser humano) que contiene comúnmente anticuerpos o partículas virales. Tales componentes son conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, sangre, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, secreciones de los tractos respiratorio, intestinal o genitourinario, lágrimas, saliva, leche, glóbulos blancos, y mielomas. Las muestras biológicas también incluyen líquidos biológicos. El término “líquido biológico” hace referencia a un fluido obtenido de un organismo. Algunos líquidos biológicos se utilizan como fuente de otros productos, tales como factores de coagulación (p. ej., Factor VIII-C), seralbúmina, hormona del crecimiento, y similares. En tales casos, es importante que la fuente de líquido biológico esté libre de contaminación por virus tal como el HCV. Las muestras biológicas también son referidas como “componentes corporales”.

La frase “fase sólida” hace referencia a un cuerpo sólido al cual se une el anticuerpo anti-humano covalentemente o por medios no covalentes tales como la adsorción hidrófoba. Las fases sólidas facilitan la separación de la muestra del anticuerpo después de la incubación. Los ejemplos preferidos de fases sólidas que se pueden utilizar son nitrocelulosa (p. ej., en forma de membrana o de pocillo de microtitulación), poli(cloruro de vinilo) (p. ej., en láminas o pocillos de microtitulación), látex de poliestireno (p. ej., en cuentas o placas de microtitulación, poli(fluoruro de vinilideno) (conocido como Immulon®)), papel diazotado, membranas de nailon, cuentas activadas, cuentas de proteína A, partículas de látex magnéticas (MLP), partículas paramagnéticas (PMP), y cuentas paramagnéticas. Por ejemplo, se pueden utilizar placas de microtitulación Dynatech Immulon® 1 o Immulon® 2 o cuentas de poliestireno de 0,635 cm (Precision Plastic Ball).

Un aspecto de la presente invención está dirigido a métodos para detectar el virus de la hepatitis C en una muestra biológica. Se pueden utilizar numerosos formatos de inmunoensayo según la presente invención. El formato de inmunoensayo, no obstante, debe permitir la interacción entre los componentes, es decir, los anticuerpos y las proteínas que pueden estar presentes en la muestra biológica. Un formato de inmunoensayo preferido es un ensayo de captura de antígenos ELISA descrito más abajo con más detalle. No obstante, formatos de inmunoensayo equivalentes son conocidos por los expertos en la técnica y están incluidos en el alcance de la invención.

Un método de detección de complejos inmunitarios del virus de la hepatitis C y un anticuerpo en un paciente comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo anti-humano y al menos un anticuerpo monoclonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C en condiciones que permiten una reacción inmunológica entre los anticuerpos y la muestra, y detectar la presencia de complejos inmunitarios de los anticuerpos y la proteína de la envuelta que pueden estar presentes en la muestra biológica. Semejante configuración de ensayo se muestra en la Figura 1B. Esta configuración de ensayo puede detectar complejos inmunitarios que comprenden anticuerpos anti-HCV humanos unidos a las proteínas E1 y E2 presentes en las muestras biológicas.

En el método de la presente invención, se pone en contacto un anticuerpo policlonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C con el anticuerpo anti-humano, antes de poner en contacto la muestra biológica, en condiciones que permiten una reacción inmunológica entre el anticuerpo anti-humano y los anticuerpos policlonales anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C. Las realizaciones preferidas de semejante configuración de ensayo se muestran en las Figuras 1A y 1C. Esta configuración del ensayo puede detectar el antígeno de la envuelta libre (Figura 1A) así como los complejos inmunitarios que comprenden anticuerpos anti-HCV humanos unidos a las proteínas E1 y/o E2 (Figura 1C).

El anticuerpo anti-humano se puede obtener comercialmente de diversas fuentes incluyendo, por ejemplo, Boehringer-Mannheim. Se puede utilizar cualquier anticuerpo anti-humano en la presente invención y puede derivar de cualquier animal o se puede preparar sintéticamente. Un anticuerpo preferido es la IgG anti-humana de ratón obtenida de Walpole. Tales anticuerpos también son capaces de unirse a anticuerpos de primate, tales como, por ejemplo, anticuerpos policlonales anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C de primate. Preferiblemente, el anticuerpo anti-humano se ancla a una fase sólida mediante mecanismos normalizados conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, la fase sólida es una placa de microtitulación, partículas paramagnéticas o cuentas paramagnéticas. Preferiblemente, los anticuerpos anti-humanos se diluyen a concentraciones óptimas en PBS (pH 7,4) y se aplican como recubrimiento sobre PMP.

Los anticuerpos policlonales anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C se pueden generar utilizando mecanismos de generación de anticuerpos normalizados bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos anticuerpos policlonales son reconocidos por el anticuerpo anti-humano. Por consiguiente, los anticuerpos policlonales se generan preferiblemente utilizando primates tales como, por ejemplo, chimpancés. Preferiblemente, como se describe más abajo con mayor detalle, el primate es inmunizado con un heterodímero e1/e2.

El complejo anticuerpo anti-humano/anticuerpo policlonal anti-HCV de primate unido a la fase sólida se pone en contacto preferiblemente con la muestra biológica en condiciones que permiten una reacción inmunológica entre el anticuerpo policlonal anti-HCV y las proteínas E1 y/o E2 libres o los complejos inmunitarios de E1 o E2, si estuvieran presentes, en la muestra biológica. Tales condiciones estarán preferiblemente a temperatura, pH y fuerza iónica fisiológicos y pueden tener lugar en medios tales como, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS). Preferiblemente, las muestras biológicas, que se pueden diluir de 0 veces a 1.000 veces en un diluyente de muestras, se incuban durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 1 hora a 37°C con los anticuerpos anti-humanos unidos a PMP, se lavan después con tampón de lavado a propósito de la retención por una fuente magnética.

Después de poner en contacto la muestra biológica con los anticuerpos policlonales anti-proteína de la envuelta de HCV (Figuras 1A o 1C), la muestra biológica se pone en contacto adicionalmente con al menos un anticuerpo monoclonal que reacciona con un epítipo de cualquiera de E1 o E2 en condiciones que permiten una reacción inmunológica entre los anticuerpos anti-E1/E2 monoclonales y las proteínas E1 y/o E2, si están presentes, en la muestra biológica. Tales condiciones estarán preferiblemente a la temperatura, el pH y la fuerza iónica fisiológicos y pueden tener lugar en medios tales como, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS). Preferiblemente, los epítipos incluyen un epítipo conformacional de e2, un epítipo lineal de e2, un epítipo neutralizador de e2, un epítipo conformacional de e1, un epítipo lineal de e1, o un epítipo neutralizador de e1. Los epítipos neutralizadores pueden ser o bien lineales o bien conformacionales. En las realizaciones preferidas de la invención, la muestra biológica se pone en contacto con una combinación de anticuerpos monoclonales diferentes reactivos con estos epítipos. La combinación

de anticuerpos monoclonales puede incluir todas las posibles combinaciones de los epítomos descritos antes. Los anticuerpos monoclonales reactivos con los epítomos descritos antes pueden ser preparados por un experto en la técnica utilizando los mecanismos de producción de anticuerpos normalizados. La mezcla de la muestra biológica unida y los anticuerpos monoclonales se incuban preferiblemente durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 1 hora a 37°C, después se lava con tampón de lavado a propósito de la retención por una fuente magnética.

Con el fin de preparar anticuerpos monoclonales para E1 y E2, se preparan los antígenos de la envuelta. Se estima actualmente que el dominio E1, que se cree que corresponde a la proteína de la envuelta viral, abarca los aminoácidos 192-383 de la poliproteína de HCV (Pub. PCT Núm. WO91/15771). Después de la expresión en el sistema CHO (glicosilado), se cree que tiene un peso molecular aproximado de 35 kD determinado por SDS-PAGE. Se cree que la proteína E2, previamente denominada NS1, abarca los aminoácidos 384-800 de la poliproteína y que también es una proteína de la envuelta. Después de la expresión en un sistema CHO (glicosilado), se cree que tiene un peso molecular en gel aparente de aproximadamente 72 kD. Se entiende que estos puntos finales de la proteína son aproximaciones (p. ej., el carboxi terminal de E2 podría encontrarse en algún lugar en la región de los aminoácidos 750-820). Asimismo se entiende que la secuencia de HCV1 aislada prototipo en la solicitud PCT mencionada antes se cita solamente con fines ilustrativos y que cualquier producto aislado de HCV (véase, p. ej., las referencias citadas en la sección "Antecedentes") es una fuente adecuada de la secuencia de E1 y/o E2 para la práctica de la presente invención.

Las proteínas E1 y E2 utilizadas en la presente invención para lograr la producción de anticuerpos pueden ser proteínas virales completas, versiones sustancialmente completas de las mismas, o fragmentos funcionales de las mismas (p. ej., fragmentos que no pierden una secuencia esencial para la formación o retención de un epítomo conformacional). Las proteínas de HCV de la presente invención se pueden elaborar mediante cualquier método conveniente que proporcione el epítomo de interés. Por ejemplo, la expresión recombinante en células de mamífero o insecto es un método preferido para proporcionar antígenos E1 y/o E2 glicosilados secretados en conformación "nativa". No obstante, también puede ser posible, como se sabe para las proteínas, expresar los antígenos en otros anfitriones recombinantes y renaturalizar la proteína después de la recuperación. Asimismo se entiende que la síntesis química también puede proporcionar mimótipos de antígenos conformacionales que presentan reacción cruzada con el epítomo conformacional del antígeno "nativo".

Los complejos de E1 y/o E2 (también denominados agregados) que contienen más de un monómero de E1 o E2 también son antígenos preferidos. Los dímeros E1:E1, dímeros E2:E2, y heterodímeros E1:E2 son todos antígenos dentro del alcance de esta invención. Los agregados también pueden incluir formas más grandes, y pueden tener pesos moleculares de más de 800 kD.

Los polipéptidos de fusión que incluyen un polipéptido en el cual el antígeno o los antígenos de HCV son parte de una cadena de aminoácidos continua sencilla, cuya cadena no existe en la nativoeza, también se pueden utilizar para preparar anticuerpos monoclonales. Los antígenos de HCV pueden estar conectados directamente entre sí por enlaces peptídicos o estar separados por secuencias de aminoácidos intermedias. Los polipéptidos de fusión también pueden contener secuencias de aminoácidos exógenas para HCV.

Los métodos para preparar los antígenos E1 y E2 incluyendo aquellos con conformaciones nativas se describen en Spaete, *et al.*, *Virology*, **1992**, 188, 819-830, y en WO 92/08734 y en el Núm. de Serie de los Estados Unidos 07/758.880. Generalmente, se seleccionan células anfitrionas que permiten la formación de epítomos conformacionales nativos dentro de las proteínas de la envuelta expresadas; estas células anfitrionas pueden incluir, por ejemplo, células animales, células de insectos, células de levadura, y similares.

Las líneas celulares de mamífero asequibles como anfitriones para la expresión son conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas asequibles de la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo células HeLa, células de ovario de Hámster Chino (CHO), células de riñón de cría de hámster (BHK), y otras numerosas líneas celulares. Los promotores adecuados para las células de mamífero también son conocidos en la técnica e incluyen promotores virales tales como el del virus de Simios 40 (SV40) (Fiers, *Nature*, **1978**, 273, 113), del virus del Sarcoma de Rous (RSV), adenovirus (ADV), y virus del papiloma bovino (BPV). Las células de mamífero también pueden requerir secuencias terminadoras y secuencias de adición poliA; también se pueden incluir secuencias intensificadoras que incrementan la expresión, y asimismo pueden ser deseables secuencias que ocasionan la amplificación del gen. Estas secuencias son conocidas en la técnica.

Los vectores adecuados para la replicación en células de mamífero también son conocidos en la técnica, y pueden incluir replicones virales, o secuencias que aseguren la integración de las secuencias apropiadas que codifican los epítomos NANBV en el genoma del anfitrión.

Un vector que se utiliza para expresar el ADN foráneo, y que se puede utilizar en la preparación de vacunas es el virus Vaccinia. En este caso el ADN heterólogo se inserta en el genoma de Vaccinia. Los mecanismos para la inserción del ADN foráneo en el genoma del virus vaccinia son conocidos en la técnica, y utilizan, por ejemplo, la recombinación homóloga. La inserción del ADN heterólogo es generalmente en un gen que no es esencial en la nativoeza, por ejemplo, el gen de la timidina cinasa (*tk*), que también proporciona un marcador seleccionable. Se han descrito vectores plasmídicos que facilitan enormemente la construcción de virus recombinantes (ver, por ejemplo, Mackett, *et al.*, *J. Virol.*, **1984**, 49, 857, Chakrabarti, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, **1985**, 5, 3403; y Moss en *GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS*, Miller and Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1987, pág. 10). La

expresión del polipéptido de HCV se produce después en las células o individuos que son inmunizados con el virus vaccinia recombinante vivo.

El segmento de ADNc de HCV que codifica la secuencia deseada se inserta en un vector Vaccinia. La secuencia que codifica el polipéptido puede estar anclada a una secuencia líder. La secuencia líder puede ser la de un activador del plasminógeno tisular (TPA), o de otra fuente, v.g. la de la beta-globina. El polinucleótido heterólogo se puede insertar en un vector vaccinia que es una versión modificada de pSC11, debido a la adición de una secuencia poliligadora que contiene un sitio de clonación.

Con el fin de detectar si el polipéptido de HCV es expresado o no a partir del vector vaccinia, se pueden infectar células BSC 1 con el vector recombinante y hacerlas crecer sobre portas de microscopio en condiciones que permiten la expresión. Las células se pueden fijar después con acetona, y realizar después ensayos de inmunofluorescencia utilizando suero que se sabe que contiene anticuerpos anti-HCV para uno o varios polipéptidos codificados en la región del genoma de HCV de la cual derivaba el segmento de HCV del vector de expresión recombinante.

Otros sistemas para la expresión de E1 y E2 incluyen células de insectos y vectores adecuados para su uso en estas células. Estos sistemas son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, vectores de transferencia de expresión de insectos derivados del baculovirus virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), que es un vector de expresión viral, coadyuvante independiente. Los vectores de expresión derivados de este sistema utilizan normalmente el promotor de la polihedrina viral fuerte para conducir la expresión de los genes heterólogos. En la actualidad el vector de transferencia más comúnmente utilizado para introducir genes foráneos en AcNPV es pAc373. Se han diseñado muchos otros vectores, conocidos por los expertos en la técnica, para una expresión mejorada. Estos incluyen, por ejemplo, pVL985 (que altera el codón de inicio de la polihedrina de ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación BamHI 32 pares de bases aguas abajo del ATT; Véase Luckow y Summers, *Virology*, **1989**, 17, 31). La buena expresión de las proteínas foráneas no fusionadas requiere normalmente genes foráneos que tienen idealmente una secuencia líder corta que contiene señales de inicio de la traducción adecuadas que preceden a una señal de inicio ATG. El plásmido también contiene la señal de poliadenilación de la polihedrina y un gen de resistencia a la ampicilina (amp) y un origen de replicación para la selección y la propagación en *E. coli*.

Los métodos para la introducción de ADN heterólogo en el sitio deseado en el virus baculovirus son conocidos en la técnica. (Véase Summer y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin Núm. 1555; Ju, *et al.* (1987); Smith, *et al.*, *Mol. y Cell Biol.*, **1983**, 3, 2156-2165; y Luckow y Summers, *Virology*, **1989**, 17, 31). Por ejemplo, la inserción puede ser en un gen tal como el gen de la polihedrina, mediante recombinación homóloga; la inserción también puede ser en un sitio para una enzima de restricción construido mediante ingeniería genética en el gen de baculovirus deseado. Las secuencias insertadas pueden ser aquellas que codifican toda o segmentos variables de la poliproteína, u otros ORF que codifican polipéptidos virales. Estas señales para las modificaciones post-traduccionales, tales como la escisión de péptidos señal, la escisión proteolítica, y la fosforilación, parecen ser reconocidas por las células de insecto. Las señales requeridas para la secreción y la acumulación nuclear también parecen estar conservadas entre las células de invertebrados y las células de vertebrados. Los ejemplos de las secuencias señal de células de vertebrados que son eficaces en células de invertebrados son conocidos en la técnica, por ejemplo, la señal de la interleucina 2 humana (IL2_s) que es una señal para el transporte fuera de la célula, es reconocida y apropiadamente separada en células de insecto.

Después de preparar las proteínas E1 y E2, por ejemplo mediante los métodos descritos antes, se pueden preparar anticuerpos monoclonales para los epítomos conformacionales y epítomos lineales utilizando técnicas de anticuerpos monoclonales normalizadas. Los anticuerpos monoclonales dirigidos a epítomos conformacionales de E1 y E2 se preparan utilizando proteínas E1 y E2 nativos, intactas. Los anticuerpos monoclonales dirigidos a los epítomos lineales de E1 y E2 se preparan utilizando proteínas E1 y E2 desnaturalizadas. La presencia o ausencia de un epítomo conformacional se puede determinar fácilmente escrutando la proteína E1 o E2 con un anticuerpo y comparando su reactividad con la de una versión desnaturalizada del antígeno que conserva solamente epítomos lineales (si los hubiera). En semejante escrutinio en el que se utilizan anticuerpos policlonales, puede ser ventajoso adsorber el suero policlonal primero con la proteína E1 o E2 desnaturalizada y ver si conserva los anticuerpos para la proteína E1 o E2. Preferiblemente, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son composiciones en las que el anticuerpo deseado comprende al menos 35% del componente de proteína total en la composición. El anticuerpo deseado comprende preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 70%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y muy preferiblemente al menos aproximadamente 95% del componente de proteína total. La composición puede contener otros compuestos tales como carbohidratos, sales, lípidos, disolventes, y similares, sin afectar a la determinación del porcentaje de pureza utilizado aquí.

Los anticuerpos monoclonales preferidos para los epítomos conformacionales incluyen, pero no están limitados a, 5E5/H7 (IGg1 anti-e2 de HCV preparado a partir de los aminoácidos 1-967 de e1/e2 en células HeLa), 2A3/B12 (anti-e2 de HCV preparado a partir de los aminoácidos 1-967 de e1/e2 en células HeLa), 5E9/D10 (anti-e2 de HCV preparado a partir de los aminoácidos 1-967 de e1/e2 en células HeLa), 3F5/H6 (anti-e2 de HCV preparado a partir de los aminoácidos 1-967 de e1/e2 en células HeLa), y 291/A2 (IGg1 anti-e2 de HCV preparada a partir de los aminoácidos 384-715 de e2 en células CHO) obtenible a partir de Bio-Chilie, y 472.2.5 (anti-e2 de HCV preparado a partir del péptido e2 HV) obtenible a partir de Mimotopes, y 6A1 (IGg1 anti-e2 de HCV preparada a partir de los aminoácidos 1-967 de e1/e2 en células CHO; bloquea la unión al receptor MOLT4) y 6A21 (IGg1; bloquea la unión

al receptor MOLT4) obtenible a partir de Biocine. Los anticuerpos monoclonales preferidos para epítomos lineales incluyen, pero no están limitados a, 3D5/C3 (IgG1 anti-e1 de HCV preparada a partir de los aminoácidos 1-967 de e1/e2 en células HeLa) y 3e5-1 y 3E5-2 (IgG1 anti-e2 de HCV preparada a partir de los aminoácidos 404-661 de e2 en células de insecto) obtenible a partir de Bio-Chilie. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales adicionales como se describe en la presente memoria utilizando métodos bien conocidos por el experto en la técnica.

La presencia de complejos inmunitarios entre las proteínas de la envuelta en la muestra biológica y los anticuerpos monoclonales se detecta utilizando cualquiera de los numerosos métodos ampliamente conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, se pueden añadir anticuerpos secundarios marcados detectablemente a las mezclas de la muestra que reaccionan con los anticuerpos monoclonales. Preferiblemente, los anticuerpos anti-proteína de la envuelta de la hepatitis están marcados detectablemente. Las marcas pueden ser, por ejemplo, moléculas enzimáticas, fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, o colorantes. Los ensayos que amplifican las señales del complejo inmunitario también son conocidos; los ejemplos de los cuales son los ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos mediados y marcados con enzima, tales como los ensayos ELISA.

En las realizaciones preferidas de la invención, se utiliza biotina-estreptavidina para detectar los complejos inmunitarios. Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales de ratón están biotinilados. La estreptavidina conjugada con DMAE se añade a la mezcla de la muestra biológica con el fin de detectar los anticuerpos monoclonales biotinilados. En otras realizaciones preferidas de la invención, se puede intensificar la sensibilidad del sistema de detección añadiendo estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) y añadiendo con posterioridad anticuerpos secundarios dirigidos a HRP y conjugados con DMAE. Un anticuerpo secundario preferido es anti-HRP de cabra conjugado con DMAE. Otras marcas detectables adecuadas pueden sustituir DMAE como es sabido por los expertos en la técnica.

Otro aspecto de la presente invención está dirigido a un método para escrutar componentes de la sangre o sangre en cuanto al virus de la hepatitis C antes del uso de semejante sangre o componente de la sangre para preparar productos de la sangre. Preferiblemente, se descarta cualquier sangre o componente de la sangre del donante si se detectan complejos inmunitarios. El método de escrutinio de la sangre y los productos sanguíneos es esencialmente el mismo que para detectar la presencia de HCV en las muestras biológicas.

En los casos de reactividad positiva al antígeno de HCV, es preferible repetir el inmunoensayo para reducir la posibilidad de falsos positivos. Por ejemplo, en el escrutinio a gran escala de sangre para la producción de productos sanguíneos (p. ej., transfusiones de sangre, plasma, factor VIII, inmunoglobulina, etc.), las pruebas de "escrutinio" se formatean típicamente para incrementar la sensibilidad (para asegurar que no pasa sangre contaminada) a expensas de la especificidad, es decir, aumenta la tasa de falsos positivos. De este modo, es típico postergar solamente durante una prueba adicional a estos donantes que son "repetidamente reactivos", es decir, positivos en dos o más rondas del inmunoensayo de la muestra donada.

La presente invención también está dirigida al uso de los anticuerpos de la invención a propósito del sistema de detección de e1 y/o e2 de HCV descrito en la presente memoria para controlar el tratamiento de individuos infectados por el HCV. Un individuo que tiene HCV, por ejemplo, puede recibir una terapia convencional, es decir, tratamiento con interferón. Cabría esperar que tales individuos, en algún momento en el transcurso del tratamiento, experimentarían una recaída en la HCV debida, por ejemplo, al aclaramiento del interferón u otros fármacos del organismo del individuo. Un experto en la técnica puede controlar la cantidad de proteína e1 o e2 de HCV en el individuo mediante los métodos descritos antes y ser capaz de pronosticar cuándo puede ocurrir semejante recaída antes de lo que sería posible utilizando las técnicas asequibles en la actualidad para la detección de HCV que se centran en la detección de anticuerpos. De este modo, un experto en la técnica sería capaz de comenzar una segunda ronda de terapia con fármaco en una fecha más temprana.

La presente invención también está dirigida a kits para detectar el virus de la hepatitis C en una muestra biológica. Los kits comprenden anticuerpo anti-humano, al menos un anticuerpo anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C monoclonal, patrones de control de anticuerpos, e instrucciones para el uso de los componentes del kit. Los kits comprenden anticuerpo anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C. El anticuerpo anti-humano está anclado a una fase sólida. En los kits preferidos, el anticuerpo monoclonal reacciona con un epítomo seleccionado del grupo formado por un epítomo conformacional de e2, un epítomo lineal de e2, un epítomo neutralizador de e2, un epítomo conformacional de e1, un epítomo lineal de e1, y un epítomo neutralizador de e1. Otros kits preferidos comprenden una pluralidad de anticuerpos monoclonales que reaccionan con un epítomo conformacional de e2, un epítomo lineal de e2, un epítomo neutralizador de e2, un epítomo conformacional de e1, un epítomo lineal de e1, un epítomo neutralizador de e1, o una combinación de los mismos. El anticuerpo monoclonal está marcado detectablemente como se ha descrito antes.

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren la invención y no se pretende que limiten la invención en modo alguno.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Construcción de PSC59 Poli

La secuencia de HCV utilizada para la producción de E1 y E2 se aisló del plásmido pC5P-1 en forma de un fragmento *StuI* parcial/*BglII*. Este fragmento se extiende desde la primera metionina de la poliproteína de HCV-1 hasta el ácido aspártico de la posición 966. Los dominios incluidos son la nucleocápsida, C, ambas supuestas glicoproteínas de la envuelta, E1 y E2, y una forma truncada de NS2, respectivamente. Además, el fragmento también contiene aproximadamente 60 pb correspondientes a la porción de la región 5' no traducida del genoma de HCV. Un experto en la técnica también puede preparar otros fragmentos que contienen porciones de E1 y E2 según se desee.

El fragmento se trató con la polimerasa de Klenow para crear extremos romos, y después se clonó en el sitio *StuI* de un vector vaccinia, PSC59 (obtenido del Dr. B. Moss en el National Institute of Health, Bethesda, Md); no obstante se pueden utilizar otros vectores. Como resultado de la ligadura en la secuencia poliligadora del vector, el extremo C' de la región NS2 contiene una secuencia Pro-Tyr adicional.

Ejemplo 2

20 Preparación de Soluciones de Partida de Virus Vaccinia que codifica el Fragmento de Poliproteína de HCV que Incluye E1 y E2

El escrutinio del virus Vaccinia recombinante se llevó a cabo esencialmente como describen Mackett *et al.* en DNA Cloning, Vol. II (Ed. D.M. Glover, IRL Press, Oxford, England, 1985, págs. 191-211). Más específicamente, se infectó una monocapa confluyente (placa de 6 cm) de células de riñón de mono verde Africano, BSC40 con virus Vaccinia de tipo salvaje (cepa WR) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,05. Después de 2 horas de incubación a 37°C, las células se transfectaron con 25 µg de poli ADN de PSC59 utilizando el método del fosfato de calcio. Después de 4 horas de incubación, el medio se cambió a medio normal, y las células se incubaron durante 48 horas más a 37°C. Las células se recuperaron raspándolas de la placa, y el virus se liberó mediante 3 ciclos de congelación-descongelación, y el virus liberado del producto lisado celular se almacenó a -80°C.

Con el fin de escrutar el virus recombinante, se infectó una monocapa confluyente de células 143 TK⁻ humanas durante 2 horas con el producto lisado celular en diluciones seriadas 10:1. Tras la eliminación del inóculo, se añadió agarosa en suero al 1% en medio que contenía 25 µg/ml de 5-bromodesoxiuridina, y las células se incubaron 72 horas a 37°C. Las placas se visualizaron recubriendo las capa de células con agarosa al 1% más rojo neutro al 0,01%, e incubando las células durante la noche a 37°C. El recubrimiento de agarosa se separó después cuidadosamente, y la capa de células se transfirió con un filtro de nitrocelulosa maestro (S&S, BA85, 0,45 µm). Se realizó una placa de réplica del filtro maestro, y se sondeó con una sonda de hibridación marcada con P³² para la secuencia de HCV. Las placas positivas se aislaron del filtro maestro, se colocaron en 0,5 ml de medio sin suero, y se sometieron a sonicación, dos veces durante 30 segundos. El procedimiento de escrutinio se repitió dos veces para purificar en placa el virus.

Con el fin de propagar el virus Vaccinia recombinante, se infectaron diez placas (150 cm²) de células BSC40 con la solución de partida viral a un MOI de 0,5. La infección se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C, y la solución de partida viral se reemplazó por medio de nueva aportación. Después de 72 horas se recogieron las células, se suspendieron en Tris HCl 10 mM, pH 9,0, y se homogeneizaron en un triturador de tejidos Wheaton de tipo Dounce. El desecho celular se separó mediante centrifugación, los sobrenadantes se trataron con tripsina y se sometieron a sonicación, y la alícuotas de las suspensiones virales se almacenaron a -80°C.

50 Ejemplo 3

Producción de Antígenos E1/E2

Se tostaron un litro de células HeLa S3 "spinner" (en cultivo celular con agitación centrífuga) en un matraz de cultivo celular con agitación centrífuga a una densidad de 10⁶ células por ml. Las células se infectaron con el virus Vaccinia recombinante que codifica el fragmento de la poliproteína de HCV utilizando un MOI de 1,0, se incubaron durante la noche, se recogieron, y se almacenaron en forma de sedimento celular a -80°C.

El producto de expresión E1/E2 se purificó sometiendo a lisis las células en tampón hipotónico, seguido de extracción en un tampón que contenía detergente no iónico. El extracto celular se sometió a cromatografía a través de una columna de agarosa con lectina (GNA). Las proteínas deseadas se hicieron eluir de la columna con metil-α-D-manopiranosido (Sigma Corp.). Las fracciones eluidas se vigilaron en cuanto a E1 y E2 mediante transferencias Western utilizando un antisero específico originado contra E1 o E2. Las fracciones que contenían los antígenos se reunieron y se concentraron sobre una columna Sepharose-S (Pharmacia). La pureza del producto final era de aproximadamente el 70%.

Las proteínas E1 (130aa) y E2 (251aa) también se pueden expresar como antígenos internos en levadura, *S. cerevisiae*, como fusiones C-terminales con superóxido-dismutasa (SOD) humana utilizando los métodos descritos previa-

ES 2 279 766 T3

mente por Kuo *et al.*, *Science*, **1989**, 244, 362-364, y Cousens *et al.*, *Gene*, **1987**, 61, 265-272, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. Después de la rotura celular y la centrifugación, los polipéptidos de fusión con SOD insolubles se extrajeron de los sedimentos celulares utilizando urea 5 M o SDS al 1% y se purificaron utilizando la filtración en gel o una combinación de cromatografía de intercambio iónico (Q- y S-Sepharose) y cromatografía de filtración en gel (Sephacryl S-300 HR).

Los antígenos E1 y E2 nativos de HCV también se pueden purificar del retículo endoplásmico de células infectadas con el virus Vaccinia recombinante (rvv) que contienen los genes E1 y E2 de HCV completos. La purificación se puede lograr mediante cromatografía de afinidad, seguida de cromatografía de intercambio iónico en condiciones no desnaturizantes como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 92/08734 y Número de Serie de los Estados Unidos 07/758.880.

El antígeno E2 de HCV nativo, CHO-e2, también se puede preparar esencialmente según Spaete *et al.*, *Virology*, **1992**, 188, 819-830. Más específicamente, la línea celular CHO de mamífero que produce el antígeno CHO-e2 se construye a partir de un plásmido que contiene una secuencia de HCV-1 que codifica Ala383 a Glu661. Después el plásmido se transfecta en células CHO para generar una línea estable que expresa el antígeno e2 completo (también denominado e2/ns1). Los clones que muestran una elevada expresión se seleccionan y se expanden en botellas para cultivo celular rotatorio mediante crecimiento en DME/H21 con suero de ternera fetal sometido a diálisis al 10% y los suplementos habituales más Metotrexato 1,6 μ M. El sobrenadante del medio de cultivo se recoge, y se utiliza para la purificación del antígeno CHO-e2. El esquema de purificación incluye cromatografía de afinidad y de intercambio iónico en condiciones no desnaturizantes.

Con el fin de perturbar los supuestos epítomos conformacionales e2 nativos, se prepara CHO-e2 desnaturizado mediante la adición de DL-ditiotreitol (DTT) a una concentración final de 10 mM, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,2%, y se hierve a 100°C durante 5 minutos. Todos los antígenos de HCV recombinantes tienen una pureza de al menos 90% mediante ensayo en gel de poliacrilamida SDS y se tiñen con azul Coomassie.

Ejemplo 4

Ensayo de Detección Para el Antígeno CHO-e2 Recombinante

La sensibilidad del ensayo de detección se midió utilizando antígeno CHO-e2 recombinante. Brevemente, se puso en contacto un complejo de anticuerpo policlonal anti-e1/e2 de HCV de chimpancé/IgG anti-humana de ratón/PMP con e2 de HCV recombinante producido en células CHO como se ha descrito antes. Se pusieron en contacto con el complejo una pluralidad de anticuerpos monoclonales anti-proteína de la envuelta de HCV (291/A2, anti-e2 conformacional; 1G2A7, anti-e2 neutralizador; y 3E5-2, anti-e2 lineal) a 100 ng por ensayo. Los anticuerpos monoclonales se marcaron con biotina y se utilizó el sistema de estreptavidina para medir la unión. Los resultados típicos se muestran en la Tabla 1. Los datos indican que el ensayo puede detectar el antígeno CHO-e2 a concentraciones tan bajas como 1,95 ng/ml.

TABLA 1

ng/ml CHO e2	s(RLU)	s/n
500	1.048.879	374,2
250	528.574	188,6
125	298.991	106,7
62,5	147.963	52,8
31,3	80.558	28,8
15,6	43.166	15,4
7,81	23.254	8,3
3,91	14.060	5,0
1,95	8.870	3,2
0	2.803	1

s/n es la sensibilidad (s) en unidades de luz relativas (RLU) dividido por el valor negativo medio (s a 0 ng/ml de e2).

Ejemplo 5

Ensayo de Detección Para HCV Con Muestras Biológicas Clínicas

Se comparó un ensayo de detección que detecta e2 de HCV con un ensayo de detección que detecta anticuerpos anti-HCV. Las muestras biológicas (tomas de sangre en serie) se obtuvieron de dos pacientes en diferentes momentos, por ejemplo, 4/17 (I-1), 5/10 (I-2), 5/24 (I-3), 6/8 (I-4), 6/28 (I-5), 7/19 (I-6), y 12/28 (I-7). El paciente I era un individuo que todavía no había sido seroconvertido. El paciente Y ya había seroconvertido. Se examinó cada muestra en cuanto a la presencia de proteína e2 de HCV (Ensayo de Proteína) o en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-HCV (Ensayo de Anticuerpos). Para el Ensayo de Anticuerpos, se utilizó proteína e2 de CHO unida a una fase sólida para capturar los anticuerpos anti-HCV humanos que estaban presentes en las muestras biológicas. Se utilizó un sistema de IgG anti-humana monoclonal biotinilada/estreptavidina para detectar la presencia de anticuerpos anti-HCV humanos. Para el ensayo de Proteína, se puso en contacto una fase sólida unida a IgG humana unida a un anticuerpo anti-e2 policlonal, como se ha descrito antes, con la muestra biológica. Este sistema permite detectar el antígeno de HCV libre así como los inmunocomplejos antígeno de HCV/Ig humana. Se utilizó un anticuerpo anti-e2 biotinilado, tal como, por ejemplo, una combinación de 3E5-2 y 291/A2, junto con la estreptavidina para detectar la presencia de la proteína e2 de HCV. Los resultados típicos se muestran en la Tabla 2 (Ensayo de Anticuerpos), Tabla 3 (Ensayo de Proteína) y Tabla 4 (Controles Normalizados).

TABLA 2

Ensayo de Anticuerpos

Paciente/Muestra	s(RLU)	s/n
I-1	3.865	1,29
I-2	4.666	1,56
I-3	6.884	2,29
I-4	5.159	1,72
I-5	4.297	1,43
I-6	8.131	2,71
I-7	19.589	6,53
Y-1	10.842	3,61
Y-2	32.094	10,7
Y-3	84.715	28,24
Y-4	93.047	31,02
Y-5	97.343	32,45
Y-6	75.029	25,01
Y-7	77.524	25,84

ES 2 279 766 T3

TABLA 3

Ensayo de Proteínas

Paciente/Muestra	s(RLU)	s/n
I-1	3.619	1,17
I-2	2.926	0,95
I-3	3.111	1,01
I-4	2.372	0,77
I-5	2.710	0,88
I-6	108.647	35,1
I-7	7.962	2,57
Y-1	3.265	1,05
Y-2	3.758	1,21
Y-3	3.496	1,13
Y-4	3.080	1,00
Y-5	3.034	0,98
Y-6	3.496	1,13
Y-7	4.805	1,55

TABLA 4

Controles Normalizados

Patrón e2 CHO (ng/ml)	s(RLU)	s/n
500	729.082	235,6
250	354.724	114,6
125	179.610	58,0
62,5	102.241	33,0
31,3	55.640	18,0
15,6	30.246	9,8
7,81	17.125	5,5
3,91	10.872	3,5
1,95	7.623	2,5
0	3.095	1,0
SAC	40.471	13,1
NHS	5.960	1,9

s/n es la sensibilidad (s) en unidades de luz relativas (RLU) dividida por el valor negativo medio (s a 0 ng/ml de e2).

SAC es una muestra biológica de un paciente que se sabe que está infectado con HCV y sirve como control positivo.

NHS es suero humano normal y sirve como control negativo.

Como se puede observar a partir de las Tablas 2 y 3, un experto en la técnica que utiliza el sistema de detección de la proteína de la envuelta de HCV descrito antes puede detectar la proteína e2 de HCV antes (muestra de sangre 6) que la detección de los anticuerpos anti-HCV humanos (muestra de sangre 7).

La Figura 2 es un gráfico que representa el régimen de tratamiento para el paciente I descrito antes. La muestra de sangre también se tomó con el fin de detectar la presencia de AST y ALT, enzimas del hígado que indican la presencia de lesión en el hígado. Las muestras biológicas (muestras de sangre) se examinaron en cuanto a la presencia de proteínas de HCV (línea discontinua) y anticuerpos anti-HCV humano (línea continua). También se indica en la Figura 2 la medida de la duración del tratamiento con el interferón beta y el interferón alfa. Como se puede observar, tan pronto como se detectaba lesión en el hígado mediante el control de los niveles de AST y ALT, el paciente recibía interferón beta (300 UI dos veces al día) durante el período indicado. No obstante, cuando el paciente no recibía más tratamiento con interferón beta, se producía la reinfección con HCV como indicaba la presencia de niveles elevados de ALT y AST así como un espectacular aumento en la detección de proteína de la envuelta de HCV. En cambio, el incremento del nivel de anticuerpos anti-HCV se retrasaba espectacularmente. Después de la detección de la proteína de la envuelta de HCV, el paciente se trataba inmediatamente con interferón alfa lo que producía una disminución de la infección con HCV. De este modo, los resultados representados en la Figura 2 demuestran que la detección de la proteína de la envuelta de HCV constituye una espectacular mejora sobre la detección de anticuerpos anti-HCV humano en muestras biológicas y también muestra el impacto del sistema de detección sobre el control del tratamiento del HCV convencional.

Ejemplo 6

Ensayo de Detección Para HCV que Forma Inmunocomplejos

El sistema de detección descrito en la presente memoria también se puede utilizar para detectar antígenos de la envuelta de HCV que forman inmunocomplejos. Se realizó un ensayo de detección para detectar diferentes can-

5 tidades de antígeno de la envuelta de HCV que formaba inmunocomplejos en diversas muestras biológicas. Las muestras biológicas incluían I-6 (del Ejemplo 5; sin inmunocomplejo), SAC (del Ejemplo 5; inmunocomplejo ligero), Y-7 (del Ejemplo 5; inmunocomplejo medio), y JP (muestra de un paciente con una elevada seroconversión; inmunocomplejo pesado). Se examinó cada muestra en cuanto a la presencia de proteína e2 de HCV (Ensayo de Proteínas) como se ha descrito antes en el Ejemplo 5 o en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-HCV (Ensayo de Anticuerpos) como se ha descrito antes para el Ejemplo 5. Los resultados típicos se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Muestra Biológica	Ensayo de Anticuerpos		Ensayo de Proteínas	
	s(RLU)	s/n	s(RLU)	s/n
I-6	8.131	2,78	108.647	51,8
SAC	19.000	6,49	40.471	19,3
Y-7	73.524	25,13	8.963	4,3
JP	108.770	37,17	1.817	0,9

s/n es la sensibilidad (s) en unidades de luz relativas (RLU) dividida por el valor negativo medio (s a 0 ng/ml de e2).

Ejemplo 7

35 *Ensayo de Detección Intensificada para Proteínas de la Envuelta de HCV*

La sensibilidad de ensayo del sistema de detección descrito en la presente memoria se puede amplificar aplicando una amplificación de la señal a un formato de ensayo actual. Por ejemplo, se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón para la proteína e2 de HCV (5E5/H& adsorbido) unido a partículas de látex superparamagnéticas (Estapor) para capturar cantidades variables de proteína e2 de CHO. Se utilizó el anticuerpo policlonal biotinilado para e1e2 de HCV para detectar la proteína e2 de CHO. Se utilizó un complejo de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (hrp) para unir el anticuerpo policlonal biotinilado a e1e2 de HCV. Además, se utilizó un anticuerpo anti-hrp conjugado con DMAE (de diversos animales) para detectar el complejo de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (hrp), amplificando de este modo la señal. Los resultados típicos se muestran en la Tabla 6.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 279 766 T3

TABLA 6

	anti-hrp de cabra		anti-hrp de conejo		anti-hrp de ratón		anti-hrp de rata	
CHO e2 (ng/ml)	s (RLU)	s/n	s (RLU)	s/n	s (RLU)	s/n	s (RLU)	s/n
500	766.335	178,34	259.952	116,41	3.650	1,90	164.487	52,87
250	415.785	96,76	165.889	74,29	4.204	2,18	117.810	37,87
125	317.810	73,96	122.430	54,83	3.496	1,82	54.162	17,41
62,5	127.774	29,74	57.242	25,63	1.956	1,02	39.747	12,78
31,3	70.825	16,48	37.961	17,00	2.510	1,30	24.224	7,79
15,6	48.833	11,36	15.169	6,79	2.079	1,08	10.657	3,43
7,81	24.532	5,71	9.317	4,17	3.819	1,98	9.440	3,03
3,91	8.177	1,90	6.699	3,00	3.557	1,85	5.606	1,80
1,95	5.652	1,32	4.481	2,01	3.450	1,79	5.159	1,66
0	4.297	1,00	2.233	1,00	1.925	1,00	3.111	1,00

s/n es la sensibilidad (s) en unidades de luz relativas (RLU) dividida por el valor negativo medio (s a 0 ng/ml de e2).

La sensibilidad se puede incrementar adicionalmente utilizando partículas paramagnéticas (PMP) en lugar de partículas de látex magnéticas (MLP) y producto conjugado de anticuerpo secundario anti-hrp de mayor afinidad (DMAE).

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para detectar el virus de la hepatitis C en una muestra biológica, que comprende

a) poner en contacto un anticuerpo policlonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C con un anticuerpo anti-humano que está anclado a una fase sólida antes del contacto con dicha muestra biológica en condiciones que permiten una reacción de unión entre el anticuerpo anti-humano y el anticuerpo policlonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C,

b) poner en contacto dicha muestra biológica con dicho anticuerpo policlonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C que está unido al anticuerpo anti-humano,

c) poner en contacto dicha muestra biológica con al menos un anticuerpo monoclonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C, detectablemente marcado en condiciones que permiten una reacción de unión entre el anticuerpo monoclonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C y las proteínas E1 y/o E2 de la muestra, y

d) detectar la presencia de complejos inmunitarios de dicho anticuerpo monoclonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C y las proteínas E1 y/o E2 de la muestra.

2. El método de la reivindicación 1, donde dicha muestra biológica es un componente de la sangre o sangre de un donante potencial que es escrutada en cuanto al virus de la hepatitis C antes del uso de tal componente de la sangre o sangre para preparar productos sanguíneos, y donde el método comprende adicionalmente descartar cualquier sangre o componente de la sangre de dicho donante si se detectan dichos complejos.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde dicha fase sólida se selecciona del grupo que consiste en placas de microtitulación, partículas paramagnéticas, y cuentas paramagnéticas.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho anticuerpo monoclonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C reacciona con un epítipo seleccionado del grupo que consiste en un epítipo conformacional de e2, un epítipo lineal de e2, un epítipo neutralizador lineal de e2, un epítipo conformacional de e1, un epítipo lineal de e1, y un epítipo neutralizador lineal de e1.

5. Un kit para detectar el virus de la hepatitis C en una muestra biológica que comprende:

a) un anticuerpo anti-humano anclado a una fase sólida;

b) al menos un anticuerpo monoclonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C, marcado detectablemente;

c) un anticuerpo policlonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C;

d) patrones de control; y

e) instrucciones para el uso de los componentes del kit.

6. El kit de la reivindicación 5, donde dicho anticuerpo monoclonal anti-proteína de la envuelta del virus de la hepatitis C reacciona con un epítipo seleccionado del grupo que consiste en un epítipo conformacional de e2, un epítipo lineal de e2, un epítipo neutralizador lineal de e2, un epítipo conformacional de e1, un epítipo lineal de e1, y un epítipo neutralizador lineal de e1.

Configuraciones de ensayo

FIG. 1A

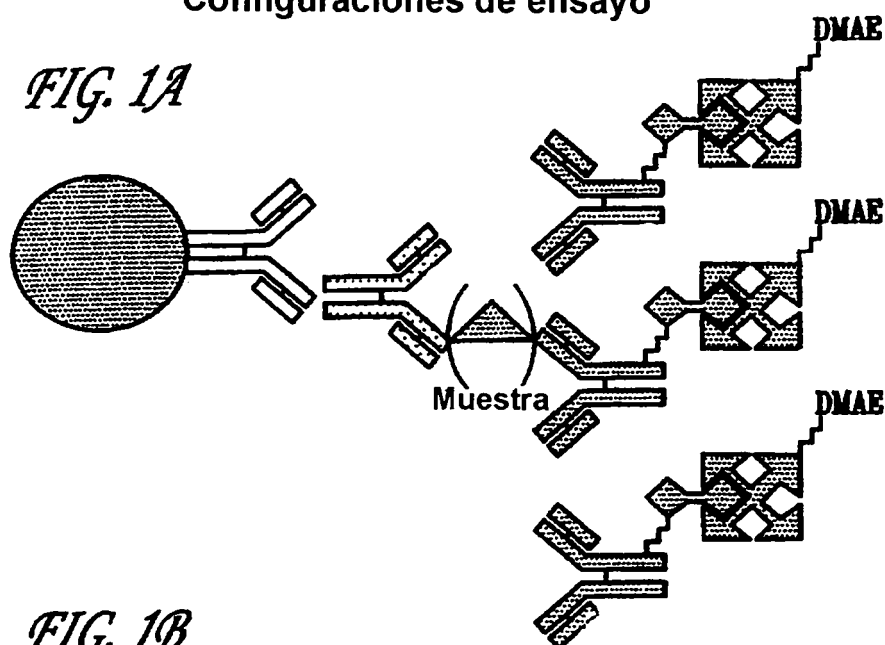


FIG. 1B

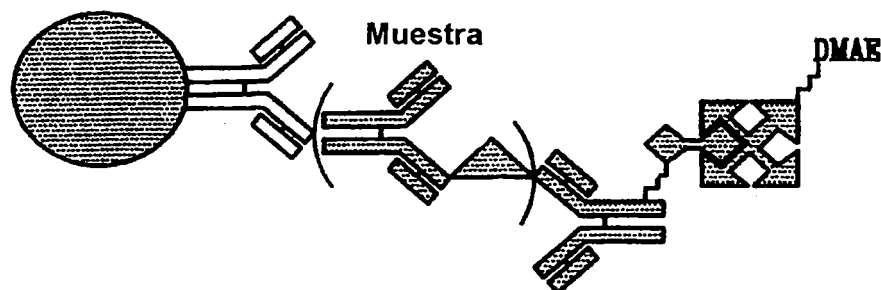


FIG. 1C

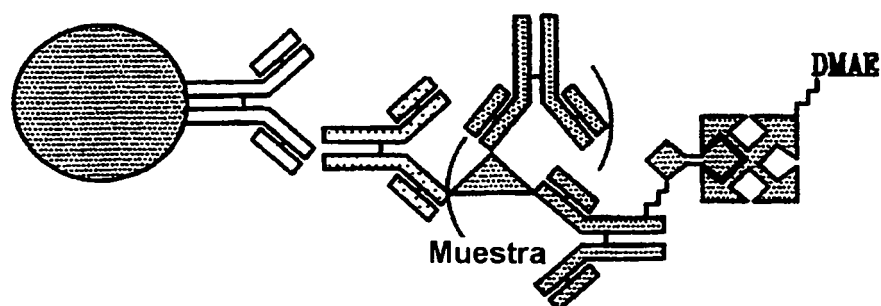


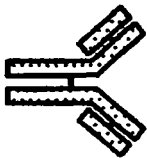
FIG. 1D



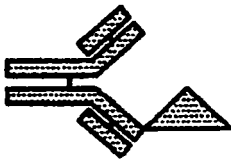
= Partícula paramagnética



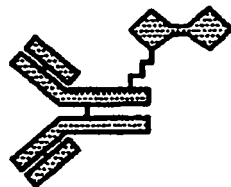
= Ig anti-humana de ratón



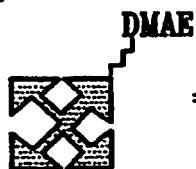
= Anticuerpo policlonal para e1/e1 de HCV



= Inmunocomplejo Muestra HCV Positiva
IgG Humana Anti-HCV



= Anticuerpo Monoclonal de Ratón
Para e2 de HCV Biotinilada



= Estreptavidina Conjugada con DMAE



= Ag

FIG. 2

