



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 434**

51 Int. Cl.:
G01N 33/576 (2006.01)
C12N 15/51 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03001660 .4**
96 Fecha de presentación : **11.08.1995**
97 Número de publicación de la solicitud: **1318401**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2003**

54 Título: **Procedimiento para la detección temprana de la seroconversión de un anticuerpo contra el virus de la hepatitis C.**

30 Prioridad: **12.08.1994 DE 4428705**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**
Sandhofer Strasse 112-132
68305 Mannheim, DE

72 Inventor/es: **Seidel, Christoph;**
Wienhues, Ursula-Henrike;
Schmitt, Urban;
Motz, Manfred;
Wiedmann, Michael;
Upmeier, Barbara y
Soutschek, Erwin

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Procedimiento para la detección temprana de la seroconversión de un anticuerpo contra el virus de la hepatitis C.

5 La invención se refiere a un procedimiento para la detección temprana de la seroconversión de un anticuerpo dirigido contra el virus de la hepatitis C (HCV), en un líquido de muestra.

10 La enfermedad designada con el nombre de hepatitis "no A - no B" está provocada en muchos casos por el virus de la hepatitis C. (HCV). En el caso del HCV se trata de un virus de ARN encapsulado monocatenario, cuyo genoma se compone aproximadamente de 9 a 10.000 bases. A partir de este genoma se codifican proteínas estructurales (proteínas del núcleo y de la envoltura) así como proteínas no estructurales. La región 3 de proteínas no estructurales (NS3) del HCV contiene una proteasa y una helicasa. La actividad proteasa está localizada en el tercio amino terminal de la región NS3.

15 En la solicitud de patente europea EP-A-0 318 216 se da a conocer una secuencia parcial de nucleótidos del HCV. Se reivindica el empleo de fragmentos de ácidos nucleicos o partes de polipéptidos del HCV para la comprobación del diagnóstico así como para el tratamiento terapéutico.

20 La patente EP-A-0 450 931 da a conocer la secuencia completa de nucleótidos y aminoácidos del HCV. Además se describe una combinación de antígenos sintéticos del HCV, los cuales comprenden un primer antígeno del HCV a partir del dominio C, y por lo menos otro antígeno del HCV a partir de uno de los dominios no estructurales NS3, NS4 ó NS5 y del dominio S de la envoltura. Un antígeno preferido del dominio NS3 es un antígeno denominado C33c, el cual comprende los aminoácidos 1192 a 1457 del genoma del HCV representado en la figura 1 de la patente EP-A-0 450 931.

25 La solicitud de patente internacional WO 92/11370 se refiere a la clonación y secuenciación de diferentes polipéptidos a partir del genoma del HCV, y al empleo de estos polipéptidos sin ningún componente de proteínas extrañas en kits de ensayo, y como vacuna. Un clon NS-3, en conexión con esta solicitud, depositado en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, BRD (DSM) con el
30 número 6847, contiene la información genética para un polipéptido de 527 aminoácidos de la región NS3 del HCV.

Mori *et al.* (Jpn. J. Cancer Res. 83 (1992), 264, 268) describen la comprobación del diagnóstico de una infección por HCV, mediante la determinación del anticuerpo vírico en sangre mediante el empleo de proteínas víricas como antígenos. Estas proteínas del HCV se expresan como proteínas de fusión con β -galactosidasa, en *E. colil*. A partir
35 de la región NS3, una proteína, la cual contiene los aminoácidos 1295 a 1541 del genoma del HCV, muestra la más alta sensibilidad. Sin embargo es desventajoso para este tipo de proteínas de fusión, que puedan tener lugar reacciones cruzadas con el componente de proteínas ya fusionadas, las cuales disminuyen la especificidad de la reacción de detección.

40 La patente JP 06074956 da a conocer un reactivo para la determinación de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (HCV) los cuales detectan específicamente un antígeno del HCV, y en particular un antígeno de la región NS3 del virus HCV. El reactivo contiene un reductor, como por ejemplo, el ditiotreitol, ditioeritritol y/o ácido tioglicólico. El empleo de este reactivo permite la exacta determinación del antígeno con una muy alta sensibilidad.

45 Mediante la detección del HCV en sangre, se logra una alta especificidad y sensibilidad del ensayo. Además, el antígeno empleado para el ensayo debe poderse expresar con un alto rendimiento y ser estable. Hasta el momento los antígenos conocidos del genoma del HCV presentan el inconveniente de que no cumplen una o varias de las exigencias anteriores.

50 Uno de los objetivos en que se fundamenta la presente invención consiste por lo tanto en la puesta a punto de un polipéptido del genoma del HCV para un procedimiento para la detección temprana de la seroconversión de un anticuerpo dirigido contra el virus de la hepatitis C, en el cual estas desventajas del estado actual de la técnica estén solventadas, por lo menos parcialmente, y que en particular en comparación con los antígenos conocidos posea una especificidad y sensibilidad mayores así como que pueda expresarse con un alto rendimiento y sea estable.

55 Este objetivo se consigue mediante un polipéptido el cual contiene la región de la secuencia del virus de la hepatitis C, en particular, la región NS3.

60 Objetivo de la presente solicitud es por lo tanto un procedimiento para la detección temprana de la seroconversión en la detección de un anticuerpo dirigido contra el virus de la hepatitis C, en un líquido de muestra, en donde el líquido de muestra se incuba por lo menos con un polipéptido, el cual contiene la región de la secuencia del virus de la hepatitis C, en particular de la región NS3 del virus de la hepatitis C, y detecta el anticuerpo mediante una unión con el polipéptido, empleando un polipéptido de una región la cual por lo menos contiene un radical de cisteína, y se efectúa la determinación del anticuerpo en condiciones reductoras.

65 Eventualmente puede también modificarse covalentemente uno o varios radicales cisteína, o/y substituirse uno o varios radicales cisteína por otros aminoácidos.

Al contrario de otras regiones antígenas del HCV, la región NS3 contiene una acumulación particularmente grande de radicales cisteína. Aunque en el transcurso de la multiplicación de los virus la proteína NS3 sintetizada intracelularmente es estable, se demuestra que el empleo de los antígenos NS3 en las condiciones fisiológicas del tampón, por ejemplo en procedimientos de ensayos inmunológicos, es extremadamente problemático puesto que en estas condiciones los grupos sulfhidrilo libres del radical cisteína se oxidan fácilmente. Esto conduce a lesiones tanto intra- como también intermoleculares del antígeno, por lo cual su reactividad inmunológica queda claramente disminuida.

Mediante un formato de ensayo en el cual están presentes uno o varios antígenos NS3 en condiciones suavemente reductoras, por ejemplo mediante la adición de un reactivo sulfhidrilo, pudo mejorarse sorprendentemente la reactividad inmunológica de estos antígenos NS3. De esta manera se logra tanto una detección temprana de la seroconversión como también un claro reforzamiento de la señal de medición.

Un polipéptido empleado de preferencia en el procedimiento según la invención es por ejemplo un polipéptido que consta de los aminoácidos 1207 ± 10 hasta 1488 ± 10 de un virus de la hepatitis C y menos de 20, de preferencia menos de 15, aminoácidos extraños. De preferencia el polipéptido contiene los aminoácidos 1207 ± 5 hasta 1488 ± 5 , con particular preferencia 1207 ± 2 hasta 1488 ± 2 , y con la mayor preferencia, de 1207 hasta 1488 de un virus de la hepatitis C, en donde la numeración de los radicales aminoácidos se refiere a la figura 1 de la patente EP-A-0 450 931.

El polipéptido empleado en el procedimiento según la invención puede proceder de un aislado de HCV cualquiera, por ejemplo de un aislado de HCV con una secuencia de nucleótidos como se describe en la patente EP-A-0 450 931. De preferencia sin embargo, el polipéptido procede del aislado de HCV, del cual procede el clon NS3 descrito en la patente WO 92/11370, el cual fue depositado en la Colección Alemana de Micro-organismos y Cultivos Celulares GmbH (DSM), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, con el número DSM 6847. Particularmente preferido es el polipéptido empleado en el procedimiento según la invención, que puede obtenerse mediante la expresión recombinante del vector pUC-D26.

En la SEQ ID NO. 1 se muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido empleado de preferencia en el procedimiento según la invención. Los aminoácidos 1-13 son aminoácidos extraños. Los aminoácidos 14-295 proceden del HCV. Con particular preferencia el polipéptido de la presente invención contiene los aminoácidos 14-295 de la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 1 y 2, ó una secuencia de aminoácidos homóloga a la misma por lo menos en un 90%.

Además, el polipéptido empleado en el procedimiento según la invención puede ser un polipéptido como se ha definido más arriba, el cual lleva por lo menos un grupo de marcado. Como grupo de marcado entran en cuestión todos los grupos de marcado conocidos, que puedan ser detectados en un sistema de ensayo, es decir grupos de marcado detectables directa o indirectamente. A este respecto, se entiende por grupo de marcado directamente detectable, aquel grupo que produce directamente una señal detectable, por ejemplo un grupo radioactivo, un grupo enzimático, un grupo de luminiscencia, un complejo metálico, etc.. Por otra parte el grupo de marcado puede ser también un grupo indirectamente detectable por ejemplo un grupo biotina o un grupo hapteno, el cual es detectable mediante la reacción con un socio de unión apropiado (estreptavidina, avidina, o respectivamente un anticuerpo antihapteno), el cual lleva de nuevo un grupo que produce una señal. El grupo de marcado puede copularse con el antígeno de una manera ya conocida, por ejemplo mediante un espaciador bifuncional. Este tipo de procedimientos para la copulación de grupos de marcado en antígenos péptidos son ya conocidos por el experto en el terreno de la inmunología, y no es necesario describirlos aquí con más detalle.

El polipéptido empleado en el procedimiento según la invención contiene de preferencia de 1 a 12 y en particular de preferencia, de 3 a 7 grupos de marcado.

Además, el polipéptido empleado en el procedimiento según la invención puede ser un polipéptido como se ha definido más arriba, en el cual existen uno o varios grupos sulfhidrilo procedentes de radicales cisteína, en forma covalentemente modificada. Ejemplos de grupos covalentemente modificados apropiados son la maleimidodioxetilamina (MADOO), la N-metil-maleinimida (NMM), el ácido yodoacético y la yodoacetamida. Mediante la modificación covalente de la cisteína se logra una reactividad inmunológica específica particularmente alta, lo cual pudo ser demostrado por ejemplo para la modificación de NS3 y DTT.

Con particular preferencia tiene lugar la copulación covalente de grupos de marcado directa o indirectamente detectables, en los grupos sulfhidrilo del polipéptido. Ejemplos de empalmes bifuncionales SH-reactivos para el acoplamiento en grupos sulfhidrilo son la maleimidopropilamina (MP), maleimidoetilamina (MEA) y maleimidodioxetilamina (MADOO).

Además, en el procedimiento según la invención, puede preferirse emplear un polipéptido en el cual uno o varios radicales cisteína están substituidos por otros aminoácidos naturales o artificiales. De preferencia los radicales cisteína se substituyen mediante α -aminoácidos estructurales análogos, como por ejemplo la serina, o los ácidos α -aminobutíricos. Mediante substituciones de cisteína se obtiene una estabilidad particularmente alta. Esto puede demostrarse en particular para la NS3 + DTT.

El polipéptido empleado de preferencia en el procedimiento según la invención presenta frente a los polipéptidos ya conocidos, ventajas sorprendentes. Frente al antígeno C33 descrito en la patente EP-A-0 450 931, el cual contiene

los radicales aminoácidos 1192 hasta 1457 de la secuencia de HCV, muestra este polipéptido una especificidad claramente mayor, lo cual se muestra en un número estadísticamente significativamente pequeño de resultados falsamente positivos en sueros negativos. Frente al antígeno NS3 descrito en la patente WO 92/11370, el cual contiene la región de los aminoácidos 1007 hasta 1534 de la secuencia de HCV, este polipéptido muestra una estabilidad claramente mayor en las condiciones del ensayo. Frente a un polipéptido, el cual contiene los aminoácidos 1227 hasta 1528 de la región NS3 del HCV, este polipéptido tiene la ventaja de una mejor eficiencia en la expresión y una mayor sensibilidad. Debido a estas ventajas el polipéptido empleado de preferencia en el procedimiento según la invención, se muestra claramente superior a todos los antígenos HCV de la región NS3 conocidos hasta el momento.

El polipéptido empleado en el procedimiento según la invención está codificado por un ácido nucleico. Un ejemplo preferido de este ácido nucleico es la inserción de ADN extraño en el vector pUC-D26.

En la SEQ ID NO. 1 se muestra también la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica el polipéptido empleado de preferencia en el procedimiento según la invención, el cual codifica el polipéptido de SEQ ID NO. 1 y 2. Los nucleótidos 40-885 codifican la región del polipéptido que procede del HCV. El ácido nucleico que codifica el polipéptido empleado de preferencia en el procedimiento según la invención contiene de preferencia (a) los nucleótidos 40-885 de la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO. 1, ó (b) una de las secuencias de (a) en el marco de la degeneración del código genético correspondiente a la secuencia de nucleótidos.

Además, el ácido nucleico que codifica el polipéptido empleado de preferencia en el procedimiento según la invención, puede estar presente en un vector, en donde dicho vector contiene por lo menos una copia de dicho ácido nucleico. El vector es de preferencia un vector procariótico, es decir un vector apropiado para la propagación en una célula anfitriona procariótica. Ejemplos de dichos vectores están representados en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual ("Clonación molecular. Un manual de laboratorio"), segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), en particular en los capítulos 1 al 4 y 17. Con particular preferencia, el vector es un plásmido circular. El ácido nucleico que codifica el polipéptido empleado de preferencia en el procedimiento según la invención, se encuentra en el vector de preferencia bajo el control de una secuencia promotora, la cual permite la expresión del polipéptido empleado de preferencia en el procedimiento según la invención. Un ejemplo preferido de un vector de este tipo es el pUC-D26.

Un ácido nucleico descrito más arriba o un vector descrito más arriba puede estar presente en una célula, en donde dicha célula se transforma por lo menos con una copia de dicho ácido nucleico o de dicho vector. De preferencia, la célula es una célula procariótica, con particular preferencia una célula procariótica gram-negativa, y con la mayor preferencia, una célula *E. coli*.

El polipéptido empleado en el procedimiento según la invención, se emplea de preferencia como antígeno en un procedimiento de ensayo inmunológico. Por otro lado puede emplearse el polipéptido también como proteína helicasa y debido a su sobresaliente efecto antígeno puede emplearse para la obtención de una vacuna contra una infección por HCV.

El procedimiento según la invención sirve para la determinación inmunológica de un anticuerpo dirigido contra el virus de la hepatitis C en un líquido de muestra y se caracteriza porque el líquido de muestra se incuba por lo menos con un polipéptido según la invención, y dicho anti-cuerpo se detecta mediante la unión con el polipéptido. Este procedimiento inmunológico de determinación puede efectuarse mediante cualquier formato de ensayo conocido, por ejemplo, en un inmunoensayo homogéneo con una sola fase de reacción o en un inmunoensayo heterogéneo con más de una fase de reacción. De preferencia, se emplea un formato de ensayo heterogéneo, en el cual se detecta la existencia del anticuerpo en presencia de una fase sólida reactiva.

Una versión de este formato de ensayo es el llamado método de ensayo puente con doble antígeno. En un procedimiento de esta clase, se incuba el líquido de muestra con por lo menos dos polipéptidos P_1 y P_2 empleados en el procedimiento según la invención, en donde el polipéptido P_1 (a) está unido a una fase sólida o (b) está presente en una forma capaz de unirse a una fase sólida, y el polipéptido P_2 lleva un grupo de marcado. El anticuerpo en el líquido de muestra se detecta mediante la determinación del marcado en la fase sólida o/y en la fase líquida, de preferencia en la fase sólida, mediante un complejo inmovilizado, es decir unido a la fase sólida.

La realización del ensayo comprende de preferencia la mezcla del líquido de muestra con el antígeno P_2 marcado purificado, así como con el antígeno P_1 unido a la fase sólida, purificado, para obtener un complejo inmovilizado marcado a partir del antígeno marcado, el anticuerpo y el antígeno unido a la fase sólida. Frente a otros formatos de ensayo para la detección de anticuerpos, los formatos de ensayo puente conducen tanto a una mejora de la sensibilidad es decir, se detectan clases adicionales de inmunoglobulina como por ejemplo la IgM, como también la especificidad, es decir, las reactividades no específicas disminuyen con el conjugado anti-IgG.

El antígeno marcado P_2 , lleva un grupo de marcado detectable directa o indirectamente como se ha descrito más arriba. El antígeno unido a la fase sólida P_1 puede estar por ejemplo, directamente unido a la fase sólida mediante un espaciador bifuncional. Sin embargo, de preferencia, P_1 es un conjugado presente en la fase líquida, de un polipéptido utilizable en el procedimiento según la invención y un socio de reacción de un sistema de unión específico. El otro socio de reacción del sistema de unión específico está presente unido a la fase sólida. Ejemplos de dichos sistemas de unión específicos son los biotina/avidina, biotina/estreptavidina, biotina/antibiotina, hapteno/antihapteno, hidrato de

carbano/lectina, y un anticuerpo o respectivamente un fragmento de anticuerpo y un anticuerpo, contra este anticuerpo o respectivamente contra el fragmento de anticuerpo. De preferencia el antígeno P₁ está presente en forma de un conjugado de biotina.

- 5 El antígeno polipéptido se emplea en un ensayo puente con doble antígeno de este tipo, de preferencia en forma soluble para evitar aumentos del valor en vacío y una relación señal/ruido desfavorable debida a las agregaciones del antígeno. Para ello el antígeno se expresa o bien en sistemas de expresión adecuados ya disueltos, o se renaturaliza después de la expresión en forma disuelta y *en vitro* de manera ya conocida. Además, para evitar la formación de agregados moleculares reticulados covalentemente, el ensayo inmunológico puede efectuarse en condiciones suavemente reductoras (adición de reactivos suavemente reductores, de preferencia reactivos de sulfhidrilo, de preferencia DTT (ditiotreitól) ó DTE (ditioeritritól) en un margen de concentración de 1 mmol/litro hasta 25 mmoles/litro), o/y emplearse de preferencia un antígeno modificado covalentemente en los grupos sulfhidrilo o/y de preferencia un antígeno con radicales cisteína por lo menos parcialmente substituidos. Una detallada descripción del formato del ensayo en puente, se encuentra en la patente EP-A-0 280 211. Esta publicación se toma como referencia. Las condiciones reductoras son ante todo esenciales para la mejor sensibilidad (detección conversas) y la mejor estabilidad del antígeno NS3.

- El polipéptido que se emplea en el procedimiento según la invención, puede emplearse sin embargo también en otros formatos de ensayo. Un ejemplo de ello es un inmunoensayo indirecto para la detección de una inmunoglobulina específica mediante la unión a un antígeno específico de unión, y la detección indirecta mediante un conjugado con un segundo anticuerpo. En esta versión del procedimiento según la invención se incuba el líquido de muestra con un polipéptido P₁, el cual (a) está unido a una fase sólida, ó (b) está presente en una forma capaz de unirse a una fase sólida, y con otro anticuerpo dirigido contra P₁, el cual lleva un grupo de marcado. El anticuerpo que hay que determinar se detecta indirectamente por determinación del marcado en la fase sólida o/y en la fase líquida, de preferencia en la fase sólida. En este procedimiento, la señal producida en la fase sólida por un complejo inmovilizado del anticuerpo marcado y del antígeno unido a la fase sólida, es indirectamente proporcional a la concentración de los anticuerpos que hay que determinar en el líquido de muestra.

- El polipéptido empleado en el procedimiento según la invención puede estar presente en un reactivo para la determinación inmunológica de un anticuerpo dirigido contra el virus de la hepatitis C, en donde el reactivo contiene por lo menos un polipéptido empleable en el procedimiento según la invención. Si se emplea el reactivo en un ensayo puente con doble antígeno, entonces contiene de preferencia por lo menos dos polipéptidos P₁ y P₂, en donde el polipéptido P₁ (a) está unido a una fase sólida, ó (b) está presente en una forma capaz de unirse a una fase sólida, y el polipéptido P₂ lleva un grupo de marcado. La unión del polipéptido P₁ en la fase sólida puede tener lugar o bien mediante una unión directa o bien mediante un par de unión específico, de preferencia estreptavidina/avidina y biotina. Con particular preferencia el polipéptido P₁ está presente en forma biotinilada.

- El reactivo que se emplea en un ensayo inmunológico indirecto contiene de preferencia un polipéptido P₁, el cual (a) está unido a una fase sólida, ó (b) está presente en una forma capaz de unirse a una fase sólida, y un anticuerpo dirigido contra el P₁, el cual lleva un grupo de marcado. La obtención de los anticuerpos dirigidos contra el polipéptido empleado tiene lugar de manera ya conocida mediante la inmunización de animales de ensayo con el correspondiente antígeno y obtención de los antisueros policlonales del animal de ensayo. Alternativamente, se puede obtener según el procedimiento de Köhler y Milstein, o bien según otro desarrollo de este procedimiento, un anticuerpo monoclonal contra el antígeno. En lugar de un anticuerpo completo pueden emplearse también fragmentos de anticuerpo o derivados de anticuerpo.

- Otro campo de aplicación del polipéptido empleado en el procedimiento según la invención, es por ejemplo la obtención de vacunas. Para ello se obtienen los polipéptidos de preferencia en forma purificada y a continuación se preparan en forma de líquidos inyectables, los cuales pueden tratarse o bien de soluciones o bien de suspensiones del polipéptido. Los polipéptidos pueden estar también ocluidos en liposomas. Otros componentes de las vacunas son por ejemplo, el agua, soluciones salinas, glucosa o glicerina. Además, las vacunas contienen pequeñas cantidades de sustancias auxiliares, como emulsionantes, sustancias tampón, eventualmente adyuvantes, los cuales potencian la respuesta inmunológica. Las vacunas se aplican habitualmente parenteralmente mediante inyección, de preferencia subcutánea o intramuscular.

- Además, la presente invención se describe mediante los siguientes ejemplos y protocolos de secuencias.

Se muestran:

- SEQ ID NO. 1: secuencia de nucleótidos de un polipéptido empleado de preferencia en el procedimiento según la invención, codificada por un ácido nucleico,

SEQ ID NO. 2: secuencia de aminoácidos de un polipéptido empleado de preferencia en el procedimiento según la invención,

- SEQ ID NO. 3: secuencia de nucleótidos del cebador (1),

SEQ ID NO. 4: secuencia de nucleótidos del cebador (2),

ES 2 315 434 T3

SEQ ID NO. 5: secuencia de nucleótidos del cebador (3),

SEQ ID NO. 6: secuencia de nucleótidos del cebador (4),

5 SEQ ID NO. 7: secuencia de nucleótidos del cebador (5), y

SEQ ID NO. 8: secuencia de nucleótidos del cebador (6).

Ejemplos

10

Ejemplo 1

Clonación y expresión de un polipéptido con los aminoácidos 1207 a 1488 de la región NS3 del virus de la hepatitis C

15 Mediante una PCR se amplificó un fragmento de ADN a partir del clon NS3 (DSM 6847) mediante el empleo de los cebadores (1) y (2), cuyo secuencia de nucleótidos está mostrada en SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4. En el extremo 5' de este fragmento de ADN se encuentran secuencias para la clonación (puntos de escisión de restricción de BamHI-, BspHI-, EcoRI) así como un codon de ATG y un codon de AAA(Lys), para potenciar la expresión. En el extremo 3' se encuentran los puntos de escisión de restricción para HindIII y EcoRI así como un codon de interrupción
20 (TTA). La región homóloga al HCV, empieza en los cebadores (1) y (2), cada vez mediante el nucleótido número 19.

El fragmento de ADN obtenido de esta manera se empleó en un vector pUC8 escindido con BamHI y HindIII. El plásmido resultante recibió el nombre de pUC-D26.

25 Una cepa JM 109 de *E. coli* transformada con el plásmido pUC-D26 (Yanisch-Perron *et al.*, Gene 33 (1985), 103), se incubó durante la noche en 100 ml de medio (caldo L/ampicilina). A la mañana siguiente se diluyó el cultivo con 900 ml de caldo L 2x (10 g de Trypton, 10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl por litro)/ampicilina en un matraz de 3 litros. Después de la adición de 2 ml de glicerina y de 1 a 2 gotas de emulsión antiespuma de silicona (firma Serva), se agitó el cultivo a aproximadamente 185 rpm y 37°C durante 2 horas. La inducción y producción de antígeno
30 tuvo lugar mediante la adición de 2 mmoles/litro del inductor isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG), agitando de nuevo durante 3 a 4 horas. A continuación se sedimentaron las bacterias por centrifugación y siguieron procesándose.

El sedimento de bacterias de dos cultivos de 1 litro, se resuspendió en 200 ml de Tris HCl 50 mmoles/litro, pH 8,5, 0,2 mg/ml de lisozima y 2 mmoles/litro de ditione (DTE). A continuación se añadieron EDTA (concentración final: 15 mmoles/litros) fluoruro de fenilmetilsulfonilo (concentración final: 1 mmol/litro) y 4 mg de DNasa. La suspensión se mezcló durante algunos minutos con un agitador magnético y a continuación se incubó durante 45 minutos a 37°C en un baño María.

A continuación se efectuó una adición de Triton-X100 (concentración final: 1%) y se agitó durante 30 minutos en un agitador magnético. Después de congelar a -20°C durante la noche y descongelar, se agitaron las células por lo menos durante una hora a 37°C y eventualmente se trataron con ultrasonidos. La incubación a 37°C y/o el tratamiento con ultrasonidos se prolongaron el tiempo necesario para que la viscosidad de la suspensión con las células lisadas, disminuyera claramente.

45 A continuación se centrifugó a 35000 g y 4°C durante 20 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 30 ml de 50 mmoles/litro de Tris-HCl, pH 8,5, 2 mmoles/litro de DTE, 150 mmoles/litro de EDTA, y 1,5% de OGP (octil- β -D-glucopiranosido, de la firma Biomol). Esta suspensión se agitó a temperatura ambiente en el agitador magnético intensamente durante por lo menos 3 horas, y a continuación se centrifugó a 35000 g y 4°C durante 20 minutos.

50 El sedimento se disolvió en 100 ml de 8 moles/ litro de urea, 20 mmoles/litro de Tris-HCl, pH 8,5, 2 mmoles/litro de DTE, y se agitó. El antígeno disuelto se guardó congelado a -20°C hasta un procesamiento posterior.

La purificación de la proteína se efectuó mediante el siguiente paso descrito de cromatografía, el cual se efectuó a temperatura ambiente. El almacenamiento del antígeno entre los pasos de cromatografía tuvo lugar cada vez a -20°C.

55

El primer paso de cromatografía se efectuó con una columna Q-sefara Fast Flow (Pharmacia) con un tampón de 20 mmoles/litro de Tris-HCl, pH 8,5, 8 moles/litro de urea, 2 mmoles/litro de DTE. La elución tuvo lugar con un gradiente de NaCl (0 a 0,7 moles/litro). El traspaso y las fracciones se ensayaron mediante SDS-PAGE. El polipéptido empleado en el procedimiento según la inversión estaba contenido en el primer pico principal. Las fracciones positivas se reunieron y se dializaron durante la noche frente a un volumen 10 veces mayor de 4 moles/litro de urea, 2 mmoles/litro de DTE, 20 mmoles/litro de Tris-HCl, pH 7,3.

60 Para el segundo paso de cromatografía se empleó la misma columna. El tampón de columna fue el tampón de diálisis empleado después del primer paso de cromatografía. La elución tuvo lugar con un gradiente de NaCl (0 a 0,5 moles/litro) y a continuación con 1 mol/litro de NaCl, NaOH pH 13, 4 moles/litro de urea.

65

Las fracciones positivas se reunieron y se dializaron durante la noche frente al mismo tampón de más arriba.

ES 2 315 434 T3

Finalmente tuvo lugar una cromatografía con una columna S-Sefarosa Fast Flow (Pharmacia). El tampón y las condiciones de elución fueron las mismas que en el paso de cromatografía precedente.

El antígeno presenta en el gel de SDS-poliacrilamida, un tamaño de aproximadamente 41 kDa. El rendimiento es de aproximadamente 10 mg de antígeno por litro de medio de cultivo.

Ejemplo 2

Expresión de un antígeno empleado de preferencia en el procedimiento según la invención, en comparación con otros antígenos de la región HCV-NS3

Se expresaron los siguientes antígenos:

- a) antígeno D26, empleado de preferencia (aminoácidos 1207 a 1488)
- b) antígeno C33 (aminoácidos 1192 a 1457 correspondientes a la patente EP-A-0 450 931)
- c) antígeno D-27 (aminoácidos 1227 a 1528)
- d) antígeno NS-3 (aminoácidos 1007 a 1534)

La expresión del antígeno NS-3 tuvo lugar mediante el empleo del clon depositado NS-3 (DSM 6847). La clonación y expresión del antígeno C33 y D27 tuvo lugar en correspondencia al método descrito en el ejemplo 1. La región codificadora de los aminoácidos 1192 a 1457 para el C33 y los aminoácidos 1227 a 1528 para el D27, fueron amplificadas mediante una PCR a partir del plásmido pUC- N3 a partir del clon NS-3 según los métodos estándar. Para el C33 se emplearon los cebadores (3) y (4), cuyas secuencias de nucleótidos vienen dadas en SEQ ID NO. 5 ó respectivamente SEQ ID NO. 6. Para el D27 se emplearon los cebadores (5) y (6), cuyas secuencias de nucleótidos vienen dadas en SEQ ID NO. 7 ó respectivamente SEQ ID NO. 8. La región homóloga al HCV empieza en los cebadores (3) y (5) con el nucleótido número 19, y en los cebadores (4) y (6), con el nucleótido número 13.

Los fragmentos de ADN amplificados fueron insertados, después del tratamiento con las enzimas de restricción BamHI y HindIII y purificación posterior mediante electroforesis con gel de agarosa, en el vector pUC8 escindido con BamHI y HindIII. Los dos antígenos expresados a partir de los vectores pUC, muestran en los extremos N-terminales una región de 13 aminoácidos extraños no codificados en el HCV (Met-Thr-Met-Ile-Thr-Asn-Ser-Arg-Gly-Ser-Ile-Met-Lys).

A continuación se transformaron los plásmidos en *E. coli* JM109. En los clones que contienen un fragmento de ADN que codifica el antígeno C33, se expresa un antígeno con un peso molecular de aproximadamente 34 kDa (SDS-PAGE). En los clones con un fragmento de ADN, el cual codifica el antígeno D27, se ha encontrado una banda con 48 kDa.

La proporción de proteína total en el caso del C33 es aproximadamente del 10% y es casi tan grande como en el polipéptido D26. Para el D27 se ha encontrado una expresión considerablemente más débil, en el margen del 5% ó menos.

Los lisados de los clones que expresan el D26, D27, y C33, se separaron entre sí en gel de SDS, y se transfirieron sobre nitrocelulosa. Después de la incubación durante la noche con diferentes sueros positivos de HCV en una dilución de 1:100, tuvo lugar una detección del anticuerpo unido mediante un conjugado de anticuerpo IgG antihumano - peroxidasa, y reacción coloreada con 3,3'-diaminobencidín-tetracloruro (DAB)/ peróxido de hidrógeno.

En sueros fuertemente positivos se encuentra en todos los segmentos de antígeno HCV una buena reactividad. En el caso de sueros NS3-HCV débilmente positivos, el antígeno C33 muestra en comparación con el antígeno D26, en algunos casos la misma reactividad, y en otros casos una reactividad algo más baja. En el caso del D27 se encuentra sin embargo una reacción coloreada claramente disminuida con los sueros NS3 débilmente positivos.

Ejemplo 3

Investigación de la especificidad y sensibilidad de diferentes antígenos a partir de la región NS3 del HCV

Con el método de ensayo indirecto se valoró comparativamente la reactividad de diferentes antígenos a partir de la región NS3, con un total de 960 sueros negativos. En esta evaluación se encontró una especificidad claramente superior del antígeno D26 frente al antígeno de comparación C33, lo cual se exteriorizó en una cantidad considerablemente menor de resultados falsamente positivos.

ES 2 315 434 T3

Construeto	Evaluación	Evaluación
	Falsos positivos	Negativos verdaderos

5	C33	8	952
	D26	2	958

10 Además, se evaluó con el método de ensayo indirecto la reactividad de diferentes constructos NS3 con 20 sueros comparando con el status de HCV seguro. En el caso de la sensibilidad de los constructos NS3 (aminoácidos 1007 hasta 1534), C33, D26 y D27, se encontró una menor sensibilidad del antígeno D27.

Construeto	Evaluación	Evaluación
	Positivos verdaderos	Falsos negativos

20	NS3	20	0
	C33	20	0
25	D26	20	0
	D27	19	1

30
Ejemplo 4

Investigación de la estabilidad de los antígenos de la región NS3 de HCV

35 Con el método de ensayo indirecto, se evaluó comparativamente la estabilidad de los antígenos NS3 y D26. Se encontró una estabilidad claramente peor del antígeno NS3 respecto al antígeno D26 empleado de preferencia en el procedimiento según la invención. La estabilidad de los antígenos se investigó después de 72 horas de incubación a 37°C.

Construeto	Ensayo n°	Repetición de la señal
------------	-----------	------------------------

45	NS3	1	< 20 %
		2	< 20 %
	D26	1	99 %
50		2	103 %

55 Ejemplo 5

Investigación de la reactividad del antígeno HCV-NS3-helicasa en presencia o respectivamente, ausencia de reactivos reductores

60 Se ensayó el momento de la seroconversión a la vista de la reactividad de las muestras de suero extraídas en diferentes momentos, con antígeno HCV-NS3-helicasa en condiciones fisiológicas con, o respectivamente sin, 20 mmoles/litro de DTT. El método de ensayo fue un ensayo puente con doble antígeno para la detección independientemente de las clases de todas las inmunoglobulinas, en el que se empleó un antígeno provisto de un grupo de marcado electroquímico (complejo ruteniometal), y un antígeno capaz de unirse a la fase sólida (antígeno biotinilado).

65 El resultado de este ensayo se muestra en la siguiente tabla. Hay que hacer notar, que en presencia de 20 mmoles/litro de DTT fué posible una temprana detección de la seroconversión, alrededor de los 38 días. Además, se encuentra, en presencia de DTT, una señal más potente.

ES 2 315 434 T3

TABLA

Día de extracción de la sangre	Días desde el principio de extracción de la sangre	Reactividad del antígeno NS3 sin DTT (señal/corte)	Reactividad del antígeno NS3 con DTT (señal/corte)
28.07.1988	0	0,1	0,1
01.08.1988	4	0,1	0,1
08.08.1988	11	0,1	0,1
11.08.1988	14	0,1	0,1
15.08.1988	18	0,1	0,1
25.08.1988	28	0,1	0,1
29.08.1988	32	0,1	1,6*
14.09.1988	48	0,1	6,5*
05.10.1988	69	1,3*	4,8*
19.10.1988	83	2,1*	6,8*
* Señal positiva			

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la detección temprana de la seroconversión en la detección de un anticuerpo dirigido contra el virus de la hepatitis C en un líquido de muestra, en donde el líquido de muestra se incuba por lo menos con un polipéptido, el cual contiene la secuencia del virus de la hepatitis C, en particular de la región NS3 del virus de la hepatitis C, y el anticuerpo se detecta mediante una unión con el polipéptido,

caracterizado porque

10 se emplea un polipéptido de una región, la cual contiene por lo menos un radical cisteína, y la determinación del anticuerpo se efectúa en condiciones reductoras.

2. Procedimiento según la reivindicación 1,

15 **caracterizado** porque,

se efectúa según un inmunoensayo homogéneo con una sola fase de reacción o según un inmunoensayo heterogéneo, con más de una fase de reacción.

20 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2,

caracterizado porque,

25 se incuba el líquido de muestra con dos polipéptidos P_1 y P_2 , en donde el polipéptido P_1 (a) está unido a una fase sólida, ó (b) está presente en una forma capaz de unirse a una fase sólida, y el polipéptido P_2 lleva un grupo de marcado,

y el anticuerpo se detecta por determinación de la marca en la fase sólida o/y en la fase líquida.

30 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 al 3,

caracterizado porque,

35 el líquido de muestra se incuba con un polipéptido P_1 , el cual (a) está unido a una fase sólida, ó (b) está presente en una forma capaz de unirse a una fase sólida, y con otro anticuerpo dirigido contra P_1 , el cual lleva un grupo de marcado, y el cual detecta el anticuerpo a determinar mediante la determinación del marcado en la fase sólida o/y en la fase líquida.

40 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4,

caracterizado porque,

el líquido de muestra es suero humano.

45

50

55

60

65

ES 2 315 434 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACION GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: Boehringer Mannheim GmbH

(B) CALLE: Sandhofer Str. 112-132

(C) CIUDAD: Mannheim

(E) PAIS: Alemania

(F) CODIGO POSTAL: 68305

(ii) TITULO SOLICITADO: Antígeno recombinante de la región NS3 del virus de la hepatitis C

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 8

(iv) FORMA LEGIBLE POR EL COMPUTADOR:

(A) SOPORTE DE DATOS: disco flexible

(B) COMPUTADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, versión #1.25 (EPA)

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 885 pares de bases

(B) CLASE: ácido nucleico

(C) FORMA DE CADENA: ambas

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) CLASE DE MOLECULA: cDNS

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Virus de la hepatitis C

(viii) POSICION EN EL GENOMA

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: NS3

(ix) CARACTERISTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) SITUACION: 1..885

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

ES 2 315 434 T3

	ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CGG GGA TCC ATC ATG AAA TCC CCG GTG	48
	Met Thr Met Ile Thr Asn Ser Arg Gly Ser Ile Met Lys Ser Pro Val	
	1 5 10 15	
5	TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCG GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG	96
	Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val	
	20 25 30	
10	GCT CAC CTG CAT GCT CCC ACA GGC AGC GGC AAG AGC ACC AAG GTC CCG	144
	Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro	
	35 40 45	
15	GCT GCA TAC GCA GCT CAG GGC TAC AAG GTG CTA GTG CTC AAC CCT TCT	192
	Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser	
	50 55 60	
20	GTT GCT GCA ACA TTG GGC TTT GGT GCC TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG	240
	Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly	
	65 70 75 80	
25	ATC GAT CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC	288
	Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser	
	85 90 95	
30	CCC ATT ACG TAC TCC ACT TAC GGC AAG TTT CTT GCC GAC GGC GGC TGC	336
	Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys	
	100 105 110	
35	GCA GGG GGT GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG	384
	Ala Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr	
	115 120 125	
40	GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATC GGC ACT GTC CTT GAC CAA GGA GAG	432
	Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Gly Glu	
	130 135 140	
45	ACT GCG GGG GCG AAA TTG GTT GTG TTC GCC ACC GCC ACC CCT CCG GGC	480
	Thr Ala Gly Ala Lys Leu Val Val Phe Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly	
	145 150 155 160	
50	TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATT GAG GAG GTT GCT CTA TCC ACC	528
	Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr	
	165 170 175	
55	ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC CCC CTT GAG GTA ATC	576
	Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile	
	180 185 190	
60	AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG AGG AAG TGC GAT	624
	Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Arg Lys Cys Asp	
	195 200 205	
65	GAG CTC GCC ACA AAG CTG GTC GCA ATG GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC	672
	Glu Leu Ala Thr Lys Leu Val Ala Met Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr	
	210 215 220	
70	TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG ACC AGC GGT GAT GTT GTC	720
	Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val	
	225 230 235 240	
75	GTC GTG GCA ACC GAC GCC CTC ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC	768
	Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp	
	245 250 255	
80	TCG GTG ATA GAC TGC AAC ACG TGT GTC ACT CAG ACA GTC GAT TTC AGC	816
	Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser	
	260 265 270	
85	CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT GAG ACG ACC ACA CTT CCC CAG GAT GCT	864
	Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala	
	275 280 285	
90	GTC TCC CGC ACT CAA CGA CGG	885
	Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg	
	290 295	

ES 2 315 434 T3

(2) INFORMACION PARA SEC ID NO: 2:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 295 aminoácidos

(B) CLASE: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) CLASE DE MOLECULA: proteína

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Met Thr Met Ile Thr Asn Ser Arg Gly Ser Ile Met Lys Ser Pro Val

1

5

10

15

Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val
20 25 30

Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro
35 40 45

Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser
50 55 60

Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly
65 70 75 80

Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser
85 90 95

Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys
100 105 110

Ala Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr
115 120 125

Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Gly Glu
130 135 140

Thr Ala Gly Ala Lys Leu Val Val Phe Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly
145 150 155 160

Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr
165 170 175

Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile
180 185 190

Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Arg Lys Cys Asp
195 200 205

Glu Leu Ala Thr Lys Leu Val Ala Met Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr
210 215 220

Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val
225 230 235 240

Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp
245 250 255

Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser
260 265 270

Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala
275 280 285

Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg
290 295

ES 2 315 434 T3

(2) INFORMACION PARA SEC ID NO: 3:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) CLASE: ácido nucleico

(C) CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) CLASE DE MOLECULA: cDNS

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

AAGGGATCCA TCATGAAATC CCCGGTGTTC ACGGATAACT

40

(2) INFORMACION PARA SEC ID NO: 4:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) CLASE: ácido nucleico

(C) CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) CLASE DE MOLECULA: cDNS

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

GGGAAGCCTT AATTCTTACC GTCGTTGAGT GCGGGAGAC

39

(2) INFORMACION PARA SEC ID NO: 5:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) CLASE: ácido nucleico

(C) CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) CLASE DE MOLECULA: cDNS

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

GAGGGATCCA TCATGAAAGC GGTGGACTTT ATCCCTGTG

39

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) CLASE: ácido nucleico

(C) CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) CLASE DE MOLECULA: cDNS

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

GAGAAGCTTT TAACACGTGT TGCAGTCTAT CAC

33

(2) INFORMACION PARA SEC ID NO: 7:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

ES 2 315 434 T3

- (B) CLASE: ácido nucleico
- (C) CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

5

(ii) CLASE DE MOLECULA: cDNS

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

10

GAGGGATCCA TCATGAAACA CCTGCATGCT CCCACCGGC

39

(2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO: 8:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

15

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) CLASE: ácido nucleico

(C) CADENA: monocatenaria

20

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) CLASE DE MOLECULA: cDNS

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

25

GAGAAGCTTT TAATACCAAG CACAGCCTGC GTC

33

30

35

40

45

50

55

60

65