



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 312 806**

⑤1 Int. Cl.:

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **03755795 .6**

⑨6 Fecha de presentación : **08.09.2003**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1546414**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

⑤4 Título: **Ensayo del VHC.**

③0 Prioridad: **09.09.2002 US 409515 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

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

⑦2 Inventor/es: **Arcangel, Phillip y**
Chien, David

⑦4 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 312 806 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo del VHC.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere en general al diagnóstico viral. En particular, la invención se refiere a ensayos de tipo sándwich de antígeno/anticuerpo/antígeno que utilizan un primer antígeno aislado derivado de una región de la poliproteína del virus de la hepatitis C y un antígeno de fusión de múltiples epítomos que incluye múltiples epítomos de la poliproteína del VHC, múltiples epítomos que incluyen uno o más epítomos de la misma región de la poliproteína como el primer antígeno, para el diagnóstico preciso de la infección por el virus de la hepatitis C.

Antecedentes de la invención

El virus de la hepatitis C (VHC) es la causa principal de hepatitis no A, no B parenteral (NANBH) que se transmite en gran parte a través de transfusión de sangre y contacto sexual. El virus está presente en el 0,4 al 2,0% de los donantes de sangre. Se desarrolla hepatitis crónica en aproximadamente el 50% de las infecciones y de éstas, aproximadamente el 20% de los individuos infectados desarrollan cirrosis hepática que algunas veces conduce a carcinoma hepatocelular. Por consiguiente, el estudio y control de la enfermedad es de importancia médica.

El VHC se caracterizó e identificó por primera vez como una causa de NANBH por Houghten *et al.* Se conoce la secuencia genómica viral del VHC, así como procedimientos para obtener la secuencia. Véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales números WO 89/04669; WO 90/11089 y WO 90/14436. El VHC tiene un genoma de ARN monocatenario, de sentido positivo de 9,5 kb y es un miembro de la familia de virus Flaviridae. Se han identificado al menos seis genotipos distintos pero relacionados del VHC, basándose en análisis filogenéticos (Simmonds *et al.*, J. Gen. Virol. (1993) 74:2391-2399). El virus codifica una única poliproteína que tiene más de 3000 residuos de aminoácido (Choo *et al.*, Science (1989) 244:359-362; Choo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2451-2455; Han *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:1711-1715). La poliproteína se procesa de manera co- y post-traducciona l tanto en proteínas estructurales como no estructurales (NS).

En particular, tal como se muestra en la figura 1, están codificadas varias proteínas por el genoma del VHC. El orden y la nomenclatura de los productos de rotura de la poliproteína del VHC son tal como sigue: NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. La rotura inicial de la poliproteína está catalizada por proteasas del huésped que liberan tres proteínas estructurales, la proteína de la nucleocápsida N-terminal (denominada “núcleo”) y dos glicoproteínas de la envuelta, AE1“ (también conocida como E) y AE2” (también conocida como E2/NS1), así como proteínas no estructurales (NS) que contienen las enzimas virales. Las regiones NS se denominan NS2, NS3, NS4 y NS5. NS2 es una proteína integral de membrana con actividad proteolítica y, en combinación con NS3, rompe el enlace *sissle* NS2-NS3 que a su vez genera el extremo N-terminal de NS3 y libera una poliproteína grande que incluye tanto actividades serina proteasa como ARN helicasa. La proteasa NS3 sirve para procesar la poliproteína restante. En estas reacciones, NS3 libera un cofactor de NS3 (NS4a), dos proteínas (NS4b y NS5a) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5b). La finalización de la maduración de la poliproteína se inicia mediante rotura autocatalítica en la unión NS3-NS4a, catalizada por la serina proteasa NS3.

Se han descrito varios polipéptidos generales y específicos útiles como reactivos inmunológicos y de diagnóstico para el VHC, derivados de la poliproteína del VHC. Véanse, por ejemplo, Houghton *et al.*, publicaciones europeas números 318.216 y 388.232; Choo *et al.*, Science (1989) 244:359-362; Kuo *et al.*, Science (1989) 244:362-364; Houghton *et al.*, Hepatology (1991) 14:381-388; Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien *et al.*, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chien *et al.*, publicación internacional número WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional número WO 94/01778. Estas publicaciones proporcionan unos antecedentes extensos sobre el VHC en general, así como sobre la fabricación y usos de reactivos inmunológicos de polipéptido del VHC.

Procedimientos específicos, sensibles, para detectar e identificar portadores del VHC y sangre o hemoderivados contaminados con VHC proporcionarían un importante avance en medicina. La hepatitis post-transfusional (HPT) se produce en aproximadamente el 10% de los pacientes a los que se ha realizado una transfusión, y el VHC ha explicado hasta el 90% de estos casos. El cuidado de los pacientes así como la prevención y la transmisión del VHC mediante sangre y hemoderivados o mediante el contacto personal estrecho requieren herramientas de diagnóstico y pronóstico fiables. Por consiguiente, se han desarrollado varios ensayos para el serodiagnóstico de la infección por VHC. Véanse, por ejemplo, Choo *et al.*, Science (1989) 244:359-362; Kuo *et al.*, Science (1989) 244:362-364; Choo *et al.*, Br. Med. Bull. (1990) 46: 423-441; Ebeling *et al.*, Lancet (1990) 335:982-983; van der Poel *et al.*, Lancet (1990) 335:558-560; van der Poel *et al.*, Lancet (1991) 337:317-319; Chien, D.Y., publicación internacional número WO 94/01778; Valenzuela *et al.*, publicación internacional número WO 97/44469; y Kashiwakuma *et al.*, patente estadounidense número 5.871.904.

Un problema significativo encontrado en algunos ensayos a base de suero es que hay un intervalo significativo entre la infección y la detección del virus que a menudo supera los 80 días. Este intervalo del ensayo puede provocar un gran riesgo para los receptores de transfusiones de sangre. Para superar este problema, se han desarrollado pruebas a base de ácido nucleico (NAT) que detectan ARN viral directamente, y pruebas del antígeno del núcleo del VHC que

someten a ensayo el antígeno viral en lugar de la respuesta de anticuerpos. Véanse por ejemplo, Kashiwakuma *et al.*, patente estadounidense número 5.871.904; Bold *et al.*, Transfusion (2000) 40:575-579.

El documento WO 01/96870 describe un ensayo para detectar el VHC en el que se unen un epítipo de NS3/4a y un MEFA a un soporte sólido.

Chien *et al* (1999) Journal of Clinical Microbiology, vol. 37(5): 1393-97 describen un inmunoensayo que usa anticuerpo anti-ser humano unido a partículas paramagnéticas para capturar anticuerpos frente al VHC. Los anticuerpos frente al VHC se detectan usando un antígeno anti-SOD y MEFA.

El documento US 6.306.579 describe antígenos recombinantes de la región NS3 del VHC. Estos antígenos pueden usarse en un inmunoensayo para detectar el VHC.

El documento US 6.210.675 describe un ensayo para detectar NANBH (hepatitis no A, no B).

Sin embargo, persiste una necesidad de herramientas de diagnóstico y pronóstico sensibles, precisas, con el fin de proporcionar cuidados adecuados a los pacientes así como para prevenir la transmisión del VHC mediante sangre y hemoderivados o mediante el contacto personal estrecho.

Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el hallazgo de que el uso de un primer antígeno derivado de la poliproteína del VHC, en combinación con un antígeno de fusión de múltiples epítipos que incluye un epítipo de la misma región de la poliproteína del VHC que el primer antígeno, proporciona un procedimiento sensible y fiable para detectar el VHC. Los ensayos descritos en el presente documento pueden detectar la infección por VHC provocada por cualquiera de los seis genotipos conocidos del VHC.

El primer antígeno incluye un epítipo conformacional de NS3/4a y el segundo antígeno es un antígeno de fusión de múltiples epítipos que incluye uno o más epítipos de la región NS3/4a. El uso de proteínas de fusión de múltiples epítipos disminuye los problemas de enmascaramiento, mejora la sensibilidad y detecta anticuerpos proporcionando un mayor número de epítipos en un área unitaria de sustrato y mejorando la selectividad. Además, los ensayos descritos en el presente documento pueden realizarse rápidamente y pueden usarse mayores volúmenes de muestra sin efectos de fondo.

Por consiguiente, en una realización, la invención objeto se refiere a un procedimiento de detección de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica. El procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un soporte sólido de inmunoensayo que comprende antígenos del VHC unidos al mismo, en el que los antígenos del VHC están constituidos por uno o más antígenos aislados de una primera región de la poliproteína del VHC y en el que el uno o más antígenos aislados de la primera región de la poliproteína del VHC son uno o más epítipos conformacionales de NS3/4a aislados;
- (b) combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permiten a los anticuerpos frente al VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse al uno o más antígenos del VHC;
- (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos un antígeno de fusión de múltiples epítipos del VHC (MEFA) marcado de manera detectable, en el que el MEFA marcado comprende al menos un epítipo de la región NS3/4a; en el que el MEFA se une al anticuerpo frente al VHC unido;
- (d) detectar los complejos formados entre el anticuerpo frente al VHC y el uno o más antígenos de la primera región de la poliproteína del VHC y dicho MEFA, si hay alguno, como indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento de detección de la infección por VHC en una muestra biológica. El procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un soporte sólido de inmunoensayo que comprende antígenos del VHC unidos al mismo, en el que los antígenos del VHC están constituidos por uno o más antígenos de fusión de múltiples epítipos (MEFA);
- (b) combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permiten a los anticuerpos frente al VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse al uno o más MEFA;
- (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos un antígeno del VHC aislado marcado de manera detectable de una región de la poliproteína del VHC presente en el uno o más MEFA, en el que el antígeno del VHC aislado es un epítipo conformacional de NS3/4a aislado y el MEFA

ES 2 312 806 T3

comprende al menos un epítipo de la región NS3/4a, y en el que el antígeno aislado se une al anticuerpo frente al VHC unido;

- (d) detectar los complejos formados entre el anticuerpo frente al VHC y el antígeno del VHC aislado y dicho MEFA, si hay alguno, como indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

Todavía en otra realización, la invención se refiere a un procedimiento de detección de la infección por VHC en una muestra biológica. El procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un soporte sólido de inmunoensayo que comprende antígenos del VHC unidos al mismo, en el que los antígenos del VHC están constituidos por uno o más epítopos conformacionales de NS3/4a del VHC;
- (b) combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permiten a los anticuerpos frente al VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse al uno o más epítopos de NS3/4a;
- (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos un antígeno de fusión de múltiples epítopos del VHC (MEFA) marcado de manera detectable, en el que el MEFA marcado comprende al menos un epítipo de la región NS3/4a del VHC, en el que el MEFA se une al anticuerpo frente al VHC unido;
- (d) detectar los complejos formados entre el anticuerpo frente al VHC y el epítipo conformacional de NS3/4a y el MEFA, si hay alguno, como indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento de detección de la infección por VHC en una muestra biológica. El procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un soporte sólido de inmunoensayo que comprende antígenos del VHC unidos al mismo, en el que los antígenos del VHC están constituidos por uno o más antígenos de fusión de múltiples epítopos (MEFA) en el que el uno o más MEFA comprenden al menos un epítipo de la región NS3/4a del VHC;
- (b) combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permiten a los anticuerpos frente al VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse al uno o más MEFA;
- (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos un epítipo conformacional de NS3/4a del VHC marcado de manera detectable, en el que el epítipo conformacional de NS3/4a se une al anticuerpo frente al VHC unido;
- (d) detectar los complejos formados entre el anticuerpo frente al VHC y el epítipo conformacional de NS3/4a y el MEFA, si hay alguno, como indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

En los procedimientos anteriores, el epítipo conformacional de NS3/4a y/o el MEFA comprenden un epítipo de la región proteasa NS3/4a de la poliproteína del VHC y/o un epítipo de la región helicasa NS3/4a de la poliproteína del VHC. En realizaciones particulares, el epítipo conformacional de NS3/4a comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 3A-3D (SEC ID N°: 1 y 2).

En realizaciones adicionales, el MEFA comprende los aminoácidos 1193-1657, numerados en relación con la secuencia del VHC-1. Aún en otras realizaciones, el MEFA comprende un epítipo de la región c33c de la poliproteína del VHC, tales como los aminoácidos 1211-1457 y/o los aminoácidos 1192-1457, numerados en relación con el VHC-1.

En otras realizaciones, el MEFA comprende un epítipo de la región 5-1-1 de la poliproteína del VHC, tales como los aminoácidos 1689-1735, numerados en relación con el VHC-1.

En realizaciones particulares, el MEFA comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 6A-6F (SEC ID N°: 3 y 4) o la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 8A-8F (SEC ID N°: 5 y 6).

Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos. Además, se exponen diversas referencias en el presente documento que describen en más detalle ciertos procedimientos o composiciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática del genoma del VHC, que representa las diversas regiones de la poliproteína de las que se derivan los reactivos del presente ensayo (proteínas y anticuerpos).

ES 2 312 806 T3

La figura 2 es un dibujo esquemático de un ensayo de tipo sándwich de antígeno/anticuerpo/antígeno representativo según la invención, usando MEFA 12.

Las figuras 3A a 3D (SEC ID N°: 1 y 2) representan la secuencia de ADN y de aminoácidos correspondiente de un antígeno conformacional de NS3/4a representativo para su uso en los presentes ensayos. Los aminoácidos en las posiciones 403 y 404 de las figuras 3A a 3D representan sustituciones de Thr por Pro y Ser por Ile, de la secuencia de aminoácidos nativa del VHC-1.

La figura 4 es un diagrama de la construcción de pd.HCV1a.ns3ns4aPI.

La figura 5 es una representación esquemática de MEFA 12.

Las figuras 6A-6F (SEC ID N°: 3 y 4) representan la secuencia de ADN y de aminoácidos correspondiente de MEFA 12.

La figura 7 es una representación esquemática de MEFA 7.1.

Las figuras 8A-8F (SEC ID N°: 5 y 6) representan la secuencia de ADN y de aminoácidos correspondiente de MEFA 7.1.

Las figuras 9A-9C muestran MEFA representativos para su uso con los inmunoensayos objeto. La figura 9A es una representación esquemática de MEFA 3. La figura 9B es una representación esquemática de MEFA 5. La figura 9C es una representación esquemática de MEFA 6.

Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, dentro del conocimiento de la técnica. Tales técnicas se explican en detalle en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Fundamental Virology, 2ª edición, vol. I & II (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds.); Handbook of Experimental Immunology, vol. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, Protein: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

Debe indicarse que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno/a” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contenido establezca claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un antígeno” incluye una mezcla de dos o más antígenos, y similares.

Se usan las siguientes abreviaturas de aminoácidos a lo largo de todo el texto:

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
Asparagina: Asn (N)	Ácido aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (C)	Glutamina: Gln (Q)
Ácido glutámico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)
Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile (I)
Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)
Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptófano: Trp (W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

I. Definiciones

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y pretenden definirse tal como se indica a continuación.

Los términos “polipéptido” y “proteína” se refieren a un polímero de residuos de aminoácido y no se limitan a una longitud mínima del producto. Por tanto, se incluyen péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares dentro de la definición. Se abarcan por la definición tanto proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones tras la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los fines de la presente invención, un “polipéptido” se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), de la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones de los huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a amplificación por PCR.

Un polipéptido del VHC es un polipéptido, tal como se definió anteriormente, derivado de la poliproteína del VHC. No es necesario que el polipéptido se derive físicamente del VHC, sino que puede producirse de manera sintética o recombinante. Además, el polipéptido puede derivarse de cualquiera de las diversas cepas y aislados del VHC, tales como, pero sin limitarse a, cualquiera de los aislados de las cepas 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 del VHC. Se conocen varias regiones conservadas y variables entre estas cepas y, en general, las secuencias de aminoácidos de epítomos derivados de estas regiones tendrán un alto grado de homología de secuencia, por ejemplo, una homología de la secuencia de aminoácidos superior al 30%, preferiblemente superior al 40%, cuando se alinean las dos secuencias. Por tanto, por ejemplo, el término polipéptido “NS3/4a” se refiere a NS3/4a nativa de cualquiera de las diversas cepas del VHC, así como analogos, muteínas y fragmentos inmunogénicos de NS3/4a, tal como se definen adicionalmente a continuación. Se conocen los genotipos completos de muchas de estas cepas. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense número 6.150.087 y los números de acceso de GenBank AJ238800 y AJ238799.

Los términos “análogo” y “muteína” se refieren a derivados biológicamente activos de la molécula de referencia, o fragmentos de tales derivados, que conservan la actividad deseada, tal como inmunorreactividad en los ensayos descritos en el presente documento. En general, el término “análogo” se refiere a compuestos que tienen una secuencia y estructura de polipéptido nativas con una o más adiciones, sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa) y/o delecciones de aminoácidos, en relación con la molécula nativa, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad inmunogénica. El término “muteína” se refiere a péptidos que tienen uno o más peptidomiméticos (“peptoides”), tales como los descritos en la publicación internacional número WO 91/04282. Preferiblemente, el análogo o la muteína tiene al menos la misma inmunoreactividad que la molécula nativa. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar análogos y muteínas de polipéptido y se describen adicionalmente a continuación.

Los análogos particularmente preferidos incluyen sustituciones que son de naturaleza conservativa, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Específicamente, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos, aspartato y glutamato; (2) básicos, lisina, arginina, histidina; (3) no polares, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, puede pronosticarse de manera razonable que una sustitución aislada de leucina por isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado estructuralmente, no tendrán un efecto importante sobre la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos no conservativas, o incluso hasta aproximadamente 15-25 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o cualquier número entero entre 5-25, siempre que permanezca intacta la función deseada de la molécula. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente regiones de la molécula de interés que pueden tolerar el cambio mediante referencia a los gráficos de Hopp/Woods y Kyte-Doolittle, bien conocidos en la técnica.

Por “fragmento” se quiere decir un polipéptido que está constituido por sólo una parte de la secuencia y estructura de polipéptido de longitud completa intacta. El fragmento puede incluir una delección C-terminal y/o una delección N-terminal del polipéptido nativo. Un “fragmento inmunogénico” de una proteína del VHC particular incluirá generalmente al menos aproximadamente 5-10 residuos de aminoácido contiguos de la molécula de longitud completa, preferiblemente al menos aproximadamente 15-25 residuos de aminoácido contiguos de la molécula de longitud completa, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 20-50 o más residuos de aminoácido contiguos de la molécula de longitud completa, que definen un epítomo, o cualquier número entero entre 5 aminoácidos y la secuencia de longitud completa, siempre que el fragmento en cuestión conserve la inmunorreactividad en los ensayos descritos en el presente documento. Por ejemplo, los fragmentos inmunogénicos preferidos para su uso en los MEFA incluyen pero no se limitan a fragmentos del núcleo del VHC que comprenden, por ejemplo, los aminoácidos 10-45, 10-53, 67-88 y 120-130 de la poliproteína, el epítomo 5-1-1 (en la región de NS3 del genoma viral) así como epítomos definidos derivados de las regiones de E1, E2, c33c (NS3), c100 (NS4), NS3/4a y NS5 de la poliproteína del VHC, así como cualquiera de los otros diversos epítomos identificados a partir de la poliproteína del VHC. Véanse, por ejemplo, Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien *et al.*, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chien *et al.*, publicación internacional número WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional número WO 94/01778; patentes estadounidenses números 6.150.087 y 6.121.020.

El término “epítomo” tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de al menos aproximadamente 3 a 5, preferiblemente de aproximadamente 5 a 10 ó 15, y no más de aproximadamente 1.000 aminoácidos (o cualquier número entero entre ellos), que definen una secuencia que por sí misma o como parte de una secuencia mayor, se une a un anticuerpo generado en respuesta a tal secuencia. No hay un límite superior crítico para la longitud

del fragmento, que puede comprender casi la longitud completa de la secuencia de la proteína, o incluso una proteína de fusión que comprende dos o más epítomos de la poliproteína del VHC. Un epítomo para su uso en la invención objeto no se limita a un polipéptido que tiene la secuencia exacta de la parte de la proteína original de la que se deriva. De hecho, los genomas virales están en un estado de flujo constante y contienen varios dominios variables que presentan

5 grados de variabilidad relativamente altos entre aislados. Por tanto, el término “epítomo” abarca secuencias idénticas a la secuencia nativa, así como modificaciones en la secuencia nativa, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa).

Pueden identificarse regiones de un polipéptido dado que incluyen un epítomo usando muchísimas técnicas de mapeo de epítomos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, pueden determinarse epítomos lineales sintetizando, por ejemplo, de manera simultánea grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos están unidos todavía a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica

10 y se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense número 4.708.871; Geysen *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:178-182; Geysen *et al.* (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. Usando tales técnicas, se han identificado varios epítomos del VHC. Véase, por ejemplo, Chien *et al.*, *Viral Hepatitis and Liver Disease* (1994) págs. 320-324, y otros a continuación. De manera similar, se identifican fácilmente epítomos conformacionales determinando la conformación espacial de los aminoácidos tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, citado anteriormente. También pueden identificarse regiones antigénicas de proteínas usando gráficos de antigenicidad e hidropatía convencionales, tales como los calculados usando, por ejemplo, el programa Omega versión 1.0 disponible del Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el procedimiento de Hopp/Woods, Hopp *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981) 78:3824-3828 para determinar perfiles de antigenicidad

15 y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte *et al.*, *J. Mol. Biol.* (1982) 157:105-132 para los gráficos de hidropatía.

Para una descripción de diversos epítomos del VHC, véanse, por ejemplo, Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89: 10011-10015; Chien *et al.*, *J. Gastroent. Hepatol.* (1993) 8:533-39; Chien *et al.*, publicación internacional número WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional número WO 94/01778; y las patentes estadounidenses

20 números 6.280.927 y 6.150.087.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “epítomo conformacional” se refiere a una parte de una proteína de longitud completa, o un análogo o mutéina de la misma, que tiene características estructurales nativas para la secuencia de aminoácidos que codifica el epítomo dentro de la proteína natural de longitud completa. Las características estructurales nativas incluyen, pero no se limitan a, la glicosilación y la estructura tridimensional. La longitud de la secuencia que define el epítomo puede estar sometida a amplias variaciones y se cree que estos epítomos se forman mediante la conformación tridimensional del antígeno (por ejemplo, plegamiento). Por tanto, los aminoácidos que definen el epítomo pueden ser relativamente pocos en número, pero ampliamente dispersos a lo largo de la longitud de la molécula (o incluso en diferentes moléculas en el caso de dímeros, etc.), que se llevan a una conformación

25 correcta del epítomo mediante plegamiento. Las partes del antígeno entre los residuos que definen el epítomo pueden no ser críticas para la estructura conformacional del epítomo. Por ejemplo, la delección o sustitución de estas secuencias intermedias puede no afectar al epítomo conformacional siempre que se mantengan las secuencias críticas para la conformación del epítomo (por ejemplo, cisteínas implicadas en enlaces disulfuro, sitios de glicosilación, etc.).

Los epítomos conformacionales presentes, por ejemplo, en la región NS3/4a se identifican fácilmente usando los procedimientos tratados anteriormente. Además, la presencia o ausencia de un epítomo conformacional en un polipéptido dado puede determinarse fácilmente a través de la selección del antígeno de interés con un anticuerpo (suero policlonal o monoclonal frente al epítomo conformacional) y comparando su reactividad con la de una versión desnaturizada del antígeno que conserva sólo epítomos lineales (si conserva alguno). En tal selección usando anticuerpos policlonales, puede ser ventajoso absorber el suero policlonal en primer lugar con el antígeno desnaturizado y observar si conserva anticuerpos frente al antígeno de interés. Adicionalmente, en el caso de NS3/4a, una molécula que conserva la conformación nativa también tendrá actividades enzimáticas proteasa y, opcionalmente, helicasa. Tales actividades pueden detectarse usando ensayos enzimáticos, tal como se describe adicionalmente a continuación.

30

Preferiblemente, se produce un epítomo conformacional de manera recombinante y se expresa en una célula de la que puede extraerse en condiciones que conservan sus características estructurales deseadas, por ejemplo sin desnaturización del epítomo. Tales células incluyen células de bacterias, levaduras, insectos y mamíferos. La expresión y el aislamiento de epítomos conformacionales recombinantes a partir de la poliproteína del VHC se describen, por ejemplo, en las publicaciones internacionales números WO 96/04301, WO 94/01778, WO 95/33053, WO 92/08734.

35 Como alternativa, es posible expresar los antígenos y renaturalizar además la proteína tras su recuperación. También se entiende que la síntesis química también puede proporcionar mimótopos de antígeno conformacional que reaccionan de manera cruzada con el epítomo conformacional del antígeno “nativo”.

El término “antígeno de fusión de múltiples epítomos” o “MEFA” tal como se usa en el presente documento significa un polipéptido en el que múltiples antígenos del VHC son parte de una única cadena continua de aminoácidos, cadena que no se produce en la naturaleza. Los antígenos del VHC pueden conectarse directamente entre sí mediante enlaces peptídicos o pueden estar separados por secuencias de aminoácidos intermedias. Los antígenos de fusión también pueden contener secuencias exógenas a la poliproteína del VHC. Además, las secuencias del VHC presen-

40

tes puede ser de múltiples genotipos y/o aislados del VHC. Los ejemplos de MEFA particulares para su uso en los presentes inmunoensayos se detallan, por ejemplo, en las publicaciones internacionales números WO 01/96875, WO 01/09609, WO 97/44469 y las patentes estadounidenses números 6.514.731 y 6.428.792.

5 Un “anticuerpo” significa una molécula que, a través de medios químicos o físicos, se une específicamente a un polipéptido de interés. Por tanto, un anticuerpo frente a NS3/4a del VHC es una molécula que se une específicamente a un epítipo de una proteína NS3/4a del VHC. El término “anticuerpo” tal como se usa en el presente documento incluye anticuerpos obtenidos de preparaciones tanto policlonales como monoclonales, así como los siguientes: moléculas de anticuerpos híbridos (quiméricos) (véanse, por ejemplo, Winter *et al.* (1991) *Nature* 349: 293-299; y la patente estadounidense número 4.816.567); fragmentos F(ab')₂ y F(ab); moléculas de Fv (heterodímeros no covalentes, véanse, por ejemplo, Inbar *et al.* (1972) *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2659-2662; y Ehrlich *et al.* (1980) *Biochem* 19:4091-4096); moléculas de Fv de cadena sencilla (sFv) (véase, por ejemplo, Huston *et al.* (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879-5883); constructos de fragmentos de anticuerpos dimericos y triméricos; minicuerpos (véanse, por ejemplo, Pack *et al.* (1992) *Biochem* 31:1579-1584; Cumber *et al.* (1992) *J Immunology* 149B:120-126); moléculas de anticuerpos humanizados (véanse, por ejemplo, Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536; y la publicación de patente británica número GB 2.276.169, publicada el 21 de septiembre de 1994); y cualquier fragmento funcional obtenido a partir de tales moléculas, en los que tales fragmentos conservan propiedades de unión inmunológica de la molécula de anticuerpo original.

20 Una proteína “recombinante” es una proteína que conserva la actividad deseada y que se ha preparado mediante técnicas de ADN recombinante tal como se describe en el presente documento. En general, el gen de interés se clona y luego se expresa en organismos transformados, tal como se describe adicionalmente a continuación. El organismo huésped expresa el gen foráneo para producir la proteína en condiciones de expresión.

25 Por “aislado” se quiere decir, cuando se refiere a un polipéptido, que la molécula indicada está separada y diferenciada del organismo completo con el que la molécula se encuentra en la naturaleza o está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término “aislado” con respecto a un polinucleótido es una molécula de ácido nucleico que carece, en su totalidad o en parte, de las secuencias asociadas normalmente con ella en la naturaleza; o una secuencia, tal como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas en asociación con ella; o una molécula disociada del cromosoma.

30 Por “determinante antigénico equivalente” se quiere decir un determinante antigénico de diferentes subespecies o cepas del VHC, tal como de las cepas 1, 2, 3, etc. del VHC. Más específicamente, se conocen epítopos, tales como 5-1-1, y tales epítopos varían entre las cepas 1, 2 y 3. Por tanto, el epítipo 5-1-1 de las tres cepas diferentes son determinantes antigénicos equivalentes y por tanto son “copias” incluso aunque sus secuencias no sean idénticas. En general, las secuencias de aminoácidos de determinantes antigénicos equivalentes tendrán un alto grado de homología de secuencia, por ejemplo una homología de la secuencia de aminoácidos superior al 30%, preferiblemente superior al 40%, cuando se alinean las dos secuencias.

40 “Homología” se refiere a la similitud en porcentaje entre dos restos de polinucleótido o dos restos de polipéptido. Dos secuencias de ADN o dos secuencias de polipéptido son “sustancialmente homólogas” entre sí cuando las secuencias presentan una similitud de secuencia de al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente al menos aproximadamente el 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 80%-85%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%-98% a lo largo de una longitud definida de las moléculas. Tal como se usa en el presente documento, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con la secuencia de ADN o polipéptido especificada.

45 En general, “identidad” se refiere a una correspondencia de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido exacta de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptido, respectivamente. La identidad en porcentaje puede determinarse mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo entre la longitud de la secuencia más corta y multiplicando el resultado por 100.

50 Pueden usarse programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis de la similitud e identidad, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en *Atlas of Protein Sequence and Structure* M.O. Dayhoff ed., 5 supl. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Appl. Math.* 2:482-489, 1981 para el análisis de péptidos. Están disponibles programas para determinar la similitud de secuencias de nucleótidos en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package al que se hizo referencia anteriormente. Por ejemplo, puede determinarse la similitud en porcentaje de una secuencia de nucleótidos particular con respecto a una secuencia de referencia usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos.

65 Otro procedimiento de establecimiento de la similitud en porcentaje en el contexto de la presente invención es usar el paquete MPSRCH de programas cuyos derechos están registrados por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de esta

serie de paquetes, puede emplearse el algoritmo de Smith-Watennan en el que se usan parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por apertura de hueco de 12, penalización por extensión de hueco de uno y un hueco de seis). A partir de los datos generados, el valor de “coincidencia” refleja la “similitud de secuencia”. Se conocen generalmente en la técnica otros programas adecuados para calcular la identidad o similitud en porcentaje entre secuencias, por ejemplo, otro programa de alineación es BLAST, usado con parámetros por defecto. Por ejemplo, pueden usarse BLASTN y BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = convencional; filtro = ninguno; cadena = ambas; punto de corte = 60; esperado = 10; matriz = BLOSUM62; descripciones = 50 secuencias; clasificación mediante = HIGH SCORE; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Pueden encontrarse detalles de estos programas en la siguiente dirección de internet: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Como alternativa, puede determinarse la homología mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa(s) específica(s) de cadena sencilla y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Pueden identificarse secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas en un experimento de hibridación de tipo Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas, tal como se definen para ese sistema particular. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro del conocimiento de la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente; DNA Cloning, citado anteriormente; Nucleic Acid Hybridization, citado anteriormente.

“Soporte sólido común” significa una única matriz sólida a la que se unen los polipéptidos del VHC usados en los inmunoensayos objeto de manera covalente o por medios no covalentes tales como adsorción hidrófoba.

“Inmunológicamente reactivo” significa que el antígeno en cuestión reaccionará específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.

“Complejo inmunitario” significa la combinación formada cuando un anticuerpo se une a un epítipo en un antígeno.

Tal como se usa en el presente documento, una “muestra biológica” se refiere a una muestra de tejido o fluido aislada de un sujeto, que incluye pero no se limita a, por ejemplo, sangre, plasma, suero, materia fecal, orina, médula ósea, bilis, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, muestras de la piel, secreciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias y también muestras de constituyentes de cultivos celulares *in vitro* que incluyen pero no se limitan a medios condicionados que resultan del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo, células recombinantes y componentes celulares.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones “marcador” y “marcador detectable” se refieren a una molécula que puede detectarse, incluyendo, pero sin limitarse a, isótopos radiactivos, agentes que fluorescen, agentes de quimioluminiscencia, cromóforos, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, cromóforos, colorantes, iones metálicos, soles metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina, estreptavidina o haptenos) y similares. El término “agente de fluorescencia” se refiere a un sustrato o una parte del mismo que puede presentar fluorescencia en el intervalo detectable. Los ejemplos particulares de marcadores que pueden usarse en la invención incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa del rábano blanco (HRP), fluoresceína, FITC, rodamina, dansilo, umbeliferona, éster de dimetilacridinio (DMAE), rojo Texas, luminol, NADPH y α,β -galactosidasa.

II. Modos de llevar a cabo la invención

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a formulaciones o parámetros de procedimiento particulares ya que tales pueden variar, por supuesto. Debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es sólo para el fin de describir realizaciones particulares de la invención, y no pretende ser limitante.

Aunque pueden usarse varias composiciones y procedimientos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención, los materiales y procedimientos preferidos se describen en el presente documento.

Tal como se indicó anteriormente, la presente invención se basa en el descubrimiento de procedimientos de diagnóstico de tipo sándwich de antígeno/anticuerpo/antígeno novedosos para la detección de la infección por VHC de manera precisa. Los procedimientos pueden ponerse en práctica rápida y eficazmente y eliminar los efectos de fondo que pueden producirse por el uso de grandes volúmenes de muestra. Los procedimientos utilizan preferiblemente antígenos del VHC sumamente inmunogénicos que están presentes durante los estadios tempranos de la seroconversión por VHC, aumentando de ese modo la precisión de la detección y reduciendo la incidencia de resultados falsos.

En particular, los inmunoensayos descritos en el presente documento utilizan dos antígenos del VHC básicos, uno presente en la fase sólida y otro presente en la fase en disolución. Ambos antígenos pueden unirse a anticuerpos frente al VHC presentes en muestras biológicas de individuos infectados. Un antígeno usado en los ensayos objeto es un antígeno aislado de una región de la poliproteína del VHC. El segundo antígeno usado es un antígeno de fusión de

múltiples epítomos ("MEFA") que comprende diversos polipéptidos del VHC, de los mismos o bien de diferentes genotipos y aislados del VHC. El MEFA incluye al menos uno o más epítomos derivados de la misma región de la poliproteína del VHC que el antígeno del VHC aislado.

En realizaciones particularmente preferidas, uno de los antígenos usados en los ensayos objeto es un epítomo conformacional sumamente inmunogénico derivado de la región NS3/4a de la poliproteína del VHC. En estas realizaciones, el segundo antígeno usado es un MEFA que incluye uno o más epítomos de la región NS3/4a (lineales o bien conformacionales), tal como se describe adicionalmente a continuación. Por tanto, el MEFA puede incluir múltiples dominios inmunodominantes derivados de la región NS3/4a de uno o más aislados del VHC. Si se usan múltiples epítomos de NS3/4a en la fusión de múltiples epítomos, pueden ser epítomos iguales o diferentes. Como alternativa, el antígeno de fusión puede incluir uno o más epítomos derivados de la región NS3/4a, así como epítomos lineales importantes de otras regiones del VHC tales como, sin limitación, secuencias del núcleo del VHC, E1, E2, P7, NS4b, NS5a y NS5b.

Los procedimientos pueden ponerse en práctica de manera conveniente en un único ensayo, usando cualquiera de los varios formatos de ensayo descritos a continuación, tales como pero sin limitarse a, formatos de ensayo que utilizan un soporte sólido al que se unen el antígeno del VHC aislado, tal como el epítomo conformacional de NS3/4a o bien el MEFA. Por tanto, el MEFA puede proporcionarse en la fase en disolución o bien en la sólida. Si se proporciona en disolución, el antígeno del VHC aislado está presente en la fase sólida.

Por ejemplo, en el procedimiento de la invención, el ensayo se realiza sobre un soporte sólido al que se han unido uno o más polipéptidos que incluyen uno o más epítomos conformacionales derivados de la región NS3/4a de la poliproteína del VHC. En esta realización, el MEFA se proporciona en la fase en disolución. En una realización alternativa, el ensayo se realiza sobre un soporte sólido al que se han unido uno o más MEFA. En esta realización, el polipéptido que incluye el epítomo de NS3/4a conformacional se proporciona en la fase en disolución. Por tanto, si el epítomo de NS3/4a conformacional está presente sobre el soporte sólido, el MEFA está presente en la fase en disolución y viceversa.

Con el fin de entender adicionalmente la invención, se proporciona una discusión más detallada a continuación referente a los diversos MEFA y antígenos de polipéptido del VHC para su uso en los procedimientos objeto, así como la producción de las proteínas y los procedimientos de uso de las proteínas.

Antígenos del VHC y MEFA

Los genomas de las cepas del VHC contienen un único marco de lectura abierto de aproximadamente 9.000 a 12.000 nucleótidos, que se transcribe en una poliproteína. Tal como se muestra en la figura 1 y la tabla 1, una poliproteína del VHC, tras la rotura, produce al menos diez productos distintos, en el orden de NH₂-núcleo-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. El polipéptido del núcleo aparece en las posiciones 1-191, numeradas en relación con el VHC-1 (véase, Choo *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455, para el genoma del VHC-1). Este polipéptido se procesa adicionalmente para producir un polipéptido del VHC con aproximadamente los aminoácidos 1-173. Los polipéptidos de la envuelta, E1 y E2, aparecen aproximadamente en las posiciones 192-383 y 384-746, respectivamente. El dominio P7 se encuentra aproximadamente en las posiciones 747-809. NS2 es una proteína integral de la membrana con actividad proteolítica y se encuentra aproximadamente en las posiciones 810-1026 de la poliproteína. NS2, en combinación con NS3, (que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1027-1657), rompe el enlace sissle NS2-NS3 que a su vez genera el extremo N-terminal de NS3 y libera una poliproteína grande que incluye actividades tanto de serina proteasa como de ARN helicasa. La proteasa NS3, que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1027-1207, sirve para procesar la poliproteína restante. La actividad de helicasa se encuentra aproximadamente en las posiciones 1193-1657. NS3 libera un cofactor de NS3 (NS4a, que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1658-1711), dos proteínas (NS4b que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1712-1972 y NS5a que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1973-2420) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5b que se encuentra aproximadamente en las posiciones 2421-3011). La finalización de la maduración de la poliproteína se inicia mediante la rotura autocatalítica en la unión NS3-NS4a, catalizada por la serina proteasa NS3.

Tabla 1	
Dominio	Límites aproximados*
C (núcleo)	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711
NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011
*Numerados en relación con el VHC-1. Véase, Choo <i>et al.</i> (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2451-2455.	

Un componente de los procedimientos objeto es un antígeno aislado de cualquiera de la región NS3/4a de la poliproteína del VHC tal como se describió anteriormente. Se han determinado las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de varias cepas y aislados del VHC, incluyendo las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de las diversas regiones descritas anteriormente. Por ejemplo, el aislado HCV J1.1 se describe en Kubo *et al.* (1989) Japan. Nucl Acids Res. 17:10367-10372; Takeuchi *et al.* (1990) Gene 91:287-291; Takeuchi *et al.* (1990) J. Gen. Virol. 71:3027-3033; y Takeuchi *et al.* (1990) Nucl. Acids Res. 18:4626. Las secuencias codificantes completas de dos aislados independientes, HCV-J y BK, se describen por Kato *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9524-9528 y Takamizawa *et al.*, (1991) J. Virol. 65:1105-1113 respectivamente.

Las publicaciones que describen aislados del VHC-1 incluyen Choo *et al.* (1990) Brit Med. Bull. 46:423-441; Choo *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455 y Han *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1711-1715. Los aislados HC-J1 y HC-J4 del VHC se describen en Okamoto *et al.* (1991) Japan J. Exp. Med. 60:167-177. Los aislados HCT 18, HCT 23, Th, HCT 27, EC1 y EC10 del VHC se describen en Weiner *et al.* (1991) Virol. 180:842-848. Los aislados Pt-1, HCV-K1 y HCV-K2 del VHC se describen en Enomoto *et al.* (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 170:1021-1025. Los aislados A, C, D y E del VHC se describen en Tsukiyama-Kohara *et al.* (1991) Virus Genes 5:243-254.

Se ha descrito la región NS3/4a de la poliproteína del VHC y se dan a conocer la secuencia de aminoácidos y la estructura global de la proteína, por ejemplo, en Yao *et al.*, Structure (noviembre de 1999) 7:1353-1363; Sali *et al.*, Biochem. (1998) 37:3392-3401; y Bartenschlager, R, J. Viral Hepat. (1999) 6:165-181. Véase, también, Dasmahapatra *et al.*, patente estadounidense número 5.843.752. Los inmunoensayos objeto pueden utilizar al menos un epítipo conformacional derivado de la región NS3/4a que existe en la conformación tal como se encuentra en la partícula del VHC que se produce en la naturaleza o su producto infeccioso, tal como se comprueba mediante la conservación de la proteasa y, opcionalmente, actividades enzimáticas helicasa presentadas normalmente por el producto génico de NS3/4a y/o inmunorreactividad del antígeno con anticuerpos en una muestra biológica de un sujeto infectado por HCV, y una pérdida de la inmunorreactividad del epítipo con la desnaturalización del antígeno. Por ejemplo, el epítipo conformacional puede perturbarse mediante calentamiento, cambiando el pH hasta extremadamente ácido o básico o añadiendo desnaturizantes orgánicos conocidos, tales como ditioneitol (DTT) o un detergente apropiado. Véase, por ejemplo, Protein Purification Methods, a practical approach (E.L.V. Harris y S. Angal eds., IRL Press) y el producto desnaturizado en comparación con el producto que no se trata como anteriormente.

Puede determinarse la actividad de proteasa y helicasa usando ensayos enzimáticos convencionales bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad de proteasa puede determinarse usando ensayos bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Takeshita *et al.*, Anal. Biochem. (1997) 247:242-246; Kakiuchi *et al.*, J. Biochem. (1997)

122:749-755; Sali *et al.*, Biochemistry (1998) 37: 3392-3401; Cho *et al.*, J. Virol. Meth. (1998) 72:109-115; Cerretani *et al.*, Anal. Biochem. (1999) 266:192-197; Zhang *et al.*, Anal. Biochem. (1999) 270:268-275; Kakiuchi *et al.*, J. Virol. Meth. (1999) 80:77-84; Fowler *et al.*, J. Biomol. Screen. (2000) 5:153-158; y Kim *et al.*, Anal. Biochem. (2000) 284:42-48. Un ensayo particularmente conveniente para someter a prueba la actividad proteasa se expone en los ejemplos a continuación.

De manera similar, se conocen bien en la técnica ensayos de la actividad de helicasa y puede determinarse la actividad de helicasa de un epítipo de NS3/4a usando, por ejemplo, un ensayo ELISA, tal como se describe en, por ejemplo, Hsu *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998) 253:594-599; un sistema de ensayo de proximidad de centelleo, tal como se describe en Kyono *et al.*, Anal. Biochem. (1998) 257: 120-126; ensayos de selección de alto rendimiento tal como se describen, por ejemplo, en Hicham *et al.*, Antiviral Res. (2000) 46:181-193 y Kwong *et al.*, Methods Mol. Med. (2000) 24:97-116; así como mediante otros procedimientos de ensayo conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Khu *et al.*, J. Viral. (2001) 75:205-214; Utama *et al.*, Virology (2000) 273:316-324; Paolini *et al.*, J. Gen. Virol. (2000) 81: 1335-1345; Preugschat *et al.*, Biochemistry (2000) 39:5174-5183; Preugschat *et al.*, Methods Mol. Med. (1998) 19: 353-364; y Hesson *et al.*, Biochemistry (2000) 39:2619-2625.

Si se usa un epítipo de NS3/4a conformacional, la longitud del antígeno es suficiente para mantener un epítipo conformacional inmunorreactivo. A menudo, el polipéptido que contiene el antígeno usado será casi de longitud completa, sin embargo, el polipéptido también puede estar truncado, por ejemplo, para aumentar la solubilidad o para mejorar la secreción. Generalmente, el epítipo conformacional que se encuentra en NS3/4a se expresa como un polipéptido recombinante en una célula y este polipéptido proporciona el epítipo en una forma deseada, tal como se describe en detalle a continuación.

Una secuencia de aminoácidos representativa para un polipéptido de NS3/4a se muestra en las figuras 3A a 3D (SEC ID Nº: 1 y 2). La secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 2-686 de las figuras 3A a 3D corresponde a las posiciones de aminoácidos 1027-1711 del VHC-1. Se muestra un codón de iniciación (ATG) que codifica Met, como la posición 1. Adicionalmente, la Thr que aparece normalmente en la posición 1428 del VHC-1 (posición de aminoácido 403 de la figura 3) está mutada a Pro, y la Ser que aparece normalmente en la posición 1429 del VHC-1 (posición de aminoácido 404 de la figura 3) está mutada a Ile. Sin embargo, pueden usarse la secuencia nativa, con o sin una Met N-terminal, el análogo representado, con o sin la Met N-terminal, o bien otros análogos y fragmentos en los ensayos objeto, siempre que el epítipo se produzca usando un procedimiento que conserve o reinstaure su conformación nativa de modo que la actividad de proteasa y, opcionalmente la actividad de helicasa, se conservan. Dasmahapatra *et al.*, patente estadounidense número 5.843.752 y Zhang *et al.*, patente estadounidense número 5.990.276, describen ambas analogías de NS3/4a.

La proteasa NS3 de NS3/4a se encuentra aproximadamente en las posiciones 1027-1207, numeradas en relación con el VHC-1, posiciones 2-182 de la figura 3. Se conocen la estructura de la proteasa NS3 y el sitio activo. Véase, por ejemplo, De Francesco *et al.*, Antivir. Ther. (1998) 3:99-109; Koch *et al.*, Biochemistry (2001) 40:631-640. Los cambios en la secuencia nativa que se tolerarán normalmente serán aquellos fuera del sitio activo de la molécula. Particularmente, se desea mantener los aminoácidos 1- o 2-155 de la figura 3, con pocas o solamente sustituciones conservativas. Los aminoácidos que aparecen más allá de la posición 155 tolerarán cambios mayores. Adicionalmente, si se usan fragmentos de la secuencia de NS3/4a, estos fragmentos incluirán generalmente al menos los aminoácidos 1- o 2-155, preferiblemente los aminoácidos 1- o 2-175, y lo más preferiblemente los aminoácidos 1- o 2-182, con o sin la Met N-terminal. El dominio helicasa se encuentra aproximadamente en las posiciones 1193-1657 del VHC-1 (posiciones 207-632 de la figura 3). Por tanto, si se desea actividad helicasa, se mantendrá una parte de la molécula con pocos o sólo cambios conservativos. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente otras regiones que tolerarán el cambio basándose en la estructura conocida de NS3/4a.

Se conocen varios antígenos que incluyen epítopos derivados de NS3/4a, incluyendo, pero sin limitarse a antígenos derivados de las regiones c33c, c200, c100 y 5-1-1, así como proteínas de fusión que comprenden un epítipo de NS3, tal como c25.

Para una descripción de estos y otros epítopos del VHC diversos de otras regiones del VHC, véanse, por ejemplo, Houghton *et al.*, patente estadounidense número 5.350.671; Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien *et al.*, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chien *et al.*, publicación internacional número WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional número WO 94/01778; y patentes estadounidenses números 6.280.927 y 6.150.087.

Los inmunoensayos descritos en el presente documento utilizan también antígenos de fusión de múltiples epítopos (denominados "MEFA"), tal como se describe en publicaciones internacionales números WO 01/96875, WO 01/09609, WO 97/44469 y patentes estadounidenses números 6.514.731 y 6.428.792. Los MEFA para su uso en los ensayos objeto incluyen múltiples epítopos derivados de cualquiera de las diversas regiones virales mostradas en la figura 1 y tabla 1, y tal como se describió anteriormente.

Los múltiples antígenos del VHC son parte de una única cadena continua de aminoácidos, cadena que no aparece en la naturaleza. Por tanto, el orden lineal de los epítopos es diferente de su orden lineal en el genoma en el que aparecen. El orden lineal de las secuencias de los MEFA para su uso en el presente documento está dispuesto preferiblemente para una antigenicidad óptima. Preferiblemente, los epítopos provienen de más de una cepa de VHC, proporcionando

así la capacidad añadida para detectar múltiples cepas de VHC en un único ensayo. Por tanto, los MEFA para su uso en el presente documento pueden comprender diversas regiones inmunogénicas derivadas de la poliproteína descrita anteriormente.

- 5 Tal como se explicó anteriormente, se usa un epítipo de NS3/4a como antígeno del VHC aislado. En esta realización, el MEFA incluye al menos uno o más epítipos derivados de la región NS3/4a (lineal o bien conformacional). El MEFA puede incluir por tanto múltiples epítipos inmunodominantes derivados de la región NS3/4a de uno o más aislados del VHC. Si se usan múltiples epítipos de NS3/4a en la fusión de múltiples epítipos, éstos pueden ser epítipos iguales o diferentes. Como alternativa, el antígeno de fusión puede incluir uno o más epítipos derivados de la región
10 NS3/4a, así como epítipos lineales principales de otras regiones del VHC tales como, sin limitación, secuencias de E1, E2, P7, NS4b, NS5a, NS5b y del núcleo del VHC.

- Los polipéptidos que comprenden epítipos derivados de la región NS3/4a incluyen, sin limitación, polipéptidos que comprenden todas o parte de las regiones de NS3, NS4a y NS3/4a. Se conocen varios epítipos de estas regiones,
15 incluyendo, pero sin limitarse a antígenos derivados de las regiones c33c, c200 y c100, así como proteínas de fusión que comprenden un epítipo de NS3, tal como c25. Éstos y otros epítipos de NS3 son útiles en los presentes ensayos y se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Houghton *et al.*, patente estadounidense número 5.350.671; Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10011-10015; Chien *et al.*, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:533-39; Chien *et al.*, publicación internacional número WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional número WO
20 94/01778; y patentes estadounidenses números 6.346.375 y 6.150.087.

- Además, el determinante antigénico conocido como 5-1-1 está parcialmente dentro de la región de NS4a (véase la figura 1) y es particularmente útil en los MEFA para su uso en los ensayos objeto. Este determinante antigénico aparece en tres formas diferentes en tres cepas virales diferentes de VHC. Por consiguiente, en una realización preferida de la
25 invención las tres formas de 5-1-1 aparecen en el antígeno de fusión de múltiples epítipos usado en los inmunoensayos objeto.

- Los epítipos de VHC adicionales para su uso en los MEFA incluyen cualquiera de los diversos epítipos descritos anteriormente, tales como epítipos derivados de la región hipervariable de E2, tal como una región que abarca los
30 aminoácidos 384-410 ó 390-410, o la secuencia consenso de esta región, tal como se describió anteriormente (Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn) (SEC ID N°: 7), que representa una secuencia consenso para los aminoácidos 390-410 del genoma del VHC tipo 1. Un epítipo de E2 representativo presente en un MEFA de la invención puede comprender un epítipo híbrido que abarca los aminoácidos 390-444. Un epítipo de E2 híbrido puede incluir una secuencia consenso que representa los aminoácidos 390-410 fusionados a la
35 secuencia de aminoácidos nativa para los aminoácidos 411-444 de E2 del VHC.

- Tal como se explicó anteriormente, los antígenos pueden derivarse de diversas cepas de VHC. Se conocen múltiples cepas virales de VHC, y pueden usarse epítipos derivados de cualquiera de estas cepas en una proteína de fusión. Se conoce bien que cualquier especie dada de organismo varía de un organismo individual a otro y además que un
40 organismo dado como un virus puede tener varias cepas diferentes. Por ejemplo, tal como se explicó anteriormente, el VHC incluye al menos 6 genotipos. Cada uno de estos genotipos incluye determinante antigénicos equivalentes. Más específicamente, cada cepa incluye varios determinantes antigénicos que están presentes en todas las cepas del virus pero son ligeramente diferentes de una cepa viral a otra. De manera similar, también pueden estar presentes determinantes antigénicos equivalentes de la región del núcleo de diferentes cepas de VHC. En general, los determi-
45 nantes antigénicos equivalentes tienen un alto grado de homología en cuando a la secuencia de aminoácidos, grado de homología que generalmente es del 30% o más, preferiblemente del 40% o más, cuando se alinean. El epítipo de múltiples copias de la presente invención puede incluir también múltiples copias que son copias exactas del mismo epítipo.

- 50 Los MEFA representativos para su uso con los presentes ensayos se muestran en las figuras 5, 7 y 9A-9C, y se describen en las publicaciones internacionales números WO 01/96875, WO 01/09609, WO 97/44469 y las patentes estadounidenses números 6.514.731 y 6.428.792. Los MEFA representativos para su uso en el presente documento incluyen aquéllos denominados MEFA 3, MEFA 5, MEFA 6, MEFA 7.1, MEFA 12, MEFA 13 y MEFA 13.1. Ha de entenderse que estos MEFA son meramente representativos y que tendrán utilidad otros epítipos derivados del genoma
55 del VHC con los presentes ensayos y pueden incorporarse a estos u otros MEFA.

- La secuencia de ADN y secuencia de aminoácidos correspondiente de MEFA 12 se muestra en las figuras 6A a 6F (SEC ID N°:3 y 4). La fórmula estructural general para MEFA 12 se muestra en la figura 5 y es tal como sigue: hSOD-E1(tipo 1)-consenso de NVR de E2(tipo 1a)-consenso de HVR de E2(tipos 1 y 2)-c33c corta(tipo 1)-5-1-1
60 (tipo 1)-5-1-1(tipo 3)-5-1-1(tipo 2)-c100(tipo 1)-NS5(tipo 1)-NS5(tipo 1)-núcleo(tipos 1+2)-núcleo(tipos 1+2). Este epítipo de múltiples copias incluye la siguiente secuencia de aminoácidos, enumerada en relación con el VHC-1 (la numeración de los aminoácidos expuesta a continuación sigue la designación de la numeración proporcionada Choo, *et al.* (1991) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455, en la que el aminoácido n° 1 es la primera metionina codificada por la secuencia codificante de la región del núcleo): aminoácidos 1-69 de superóxido dismutasa (SOD truncada, usada
65 para potenciar la expresión recombinante de la proteína); aminoácidos 303 a 320 de la poliproteína de la región de E1; aminoácidos 390 a 410 de la poliproteína, que representa una secuencia consenso para la región hipervariable de E2 de VHC-1a; aminoácidos 384 a 414 de la poliproteína de la región de E2, que representa una secuencia consenso para las regiones hipervariables de E2 del VHC-1 y VHC-2; aminoácidos 1211-1457 de la poliproteína del VHC-1

ES 2 312 806 T3

que definen la helicasa; tres copias de un epítipo de 5-1-1, aminoácidos 1689-1735, una del VHC-1, una de VHC-3 y una del VHC-2, copias que son determinantes antigénicos equivalentes de las tres cepas virales diferente de VHC; polipéptido de VHC c100 del VHC-1, aminoácidos 1901-1936 de la poliproteína; dos copias exactas de un epítipo de la región de NS5 del VHC-1, cada una con los aminoácidos 2278 a 2313 de la poliproteína del VHC; y dos copias de tres epítopos de la región del núcleo, dos del VHC-1 y una del VHC-2, copias que son determinantes antigénicos equivalentes representados por los aminoácidos 9 a 53 y 64-88 del VHC-1 y 67-84 del VHC-2.

La tabla 2 muestra las posiciones de aminoácidos de los diversos epítopos en MEFA 12 con referencia a las figuras 6A a 6F en el presente documento (SEC ID N°:3 y 4). La numeración en las tablas es en relación con el VHC-1. Véase, Choo *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455. Los MEFA 13 y 13.1 comparten también la fórmula general especificada anteriormente para MEFA 12, con modificaciones tal como se indica en las tablas 3 y 4, respectivamente.

Tabla 2. MEFA 1 2

Nº de aa de MEFA	Sitio de extremo en 5'	Epítipo	Nº de aa de VHC	cepa
1-69	Nco1	hSOD truncada		
72-89	MluI	E1	303-320	1
92-112	Hind111	consenso de HVR1a de E2	390-410	1
113-143		consenso de HVR1+2 de E2	384-414	1,2
146-392	SpeI	C33C corta	1211-1457	1
395-441	SphI	5-1-1	1689-1735	1
444-490	NruI	5-1-1	1689-1735	3
493-539	Clal	5-1-1	1689-1735	2
542-577	AvaI	C100	1901-1936	1
580-615	XbaI	NS5	2278-2313	1
618-653	BglII	NS5	2278-2313	1
654-741	NcoI	epítopos del núcleo	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
742-829	BalI	epítopos del núcleo	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2

Tabla 3. MEFA 13				
Nº de aa de MEFA	Sitio de extremo en 5'	Epítipo	Nº de aa del VHC	Cepa
1-156	Nco1	hSOD mutada (aa 70-72, ALA)		
161-178	MluI	E1	303-320	1
181-201	Hind111	consenso de HVR1a de E2	390-410	1
202-232		consenso de HVR1+2 de E2	384-414	1,2
235-451		C33C corta	1211-1457	1
454-500	HindIII	5-1-1 Plmut*	1689-1735	1
503-549	NruI	5-1-1 Plmut*	1689-1735	3
552-598	Clal	5-1-1 Plmut*	1689-1735	2
601-636	AvaI	C100	1901-1936	1
639-674	XbaI	NS5	2278-2313	1
677-712	BglII	NS5	2278-2313	1
713-800		epítipos del núcleo	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
801-888		epítipos del núcleo	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
*Los epítipos de 5-1-1 se modifican eliminando posibles sitios de escisión (CS o CA) seleccionados como diana por la proteína recombinante NS3/4a. En lugar de CS o CA, la secuencia se ha cambiado a PI.				

Tabla 4. MEFA 13.1

Nº de aa de MEFA	Sitio de extremo en 5'	Epítipo	Nº de aa del VHC	Cepa
1-86	NcoI	hSOD mutada (aa 70-72, ALA)		
89-106	MluI	E1	303-320	1
109-129	HindIII	consenso de HVR1a de E2	390-410	1
130-160		consenso de HVR1+2 de E2	384-414	1,2
163-379		C33C corta	1211-1457	1
382-428	HindIII	5-1-1 Plmut*	1689-1735	1
431-477	NruI	5-1-1 Plmut*	1689-1735	3
480-526	Clal	5-1-1 Plmut*	1689-1735	2
529-564	AvaI	C100	1901-1936	1
567-602	XbaI	NS5	2278-2313	1
605-640	BglII	NS5	2278-2313	1
641-728		epítipos del núcleo	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
729-816		epítipos del núcleo	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
*Los epítipos de 5-1-1 se modifican eliminando posibles sitios de escisión (CS o CA) seleccionados como diana por la proteína recombinante de NS3/4a. En lugar de CS o CA, la secuencia se ha cambiado a PI.				

La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos correspondiente de otro antígeno de fusión de múltiples epítipos representativo, MEFA 7.1, se muestra en las figuras 8A a 8F (SEC ID N°: 5 y 6). La fórmula estructural general para MEFA 7.1 se muestra en la figura 7 y es tal como sigue: hSOD-E1(tipo 1)-consenso de HVR de E2(tipo 1a)-consenso de HVR de E2(tipos 1 y 2)-helicasa(tipo 1)-5-1-1(tipo 1)-5-1-1(tipo 3)-5-1-1(tipo 2)-c100(tipo 1)-NS5(tipo 1)-NS5(tipo 1)-núcleo(tipos 1+2)-núcleo(tipos 1+2). Este epítipo de múltiples copias incluye la siguiente secuencia de aminoácidos, numerada en relación con el VHC-1 (la numeración de los aminoácidos expuesta a continuación sigue la designación de la numeración proporcionada en Choo, *et al.* (1991) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455, en la que el aminoácido n° 1 es la primera metionina codificada por la secuencia codificante de la región del núcleo): aminoácidos 1-156 de superóxido dismutasa (SOD, usada para potenciar la expresión recombinante de la proteína); aminoácidos 303 a 320 de la poliproteína de la región de E1; aminoácidos 390 a 410 de la poliproteína, que representan una secuencia consenso para la región hipervariable de E2 de VHC-1a; aminoácidos 384 a 414 de la poliproteína de la región de E2, que representan una secuencia consenso para las regiones hipervariables de E2 del VHC-1 y VHC-2; aminoácidos 1193-1658 de la poliproteína del VHC-1 que definen la helicasa; tres copias de un epítipo de 5-1-1,

ES 2 312 806 T3

aminoácidos 1689-1735, una del VHC-1, una del VHC-3 y una del VHC-2, copias que son determinantes antigénicos equivalentes de las tres cepas virales diferentes del VHC; polipéptido del VHC C100 del VHC-1, aminoácidos 1901-1936 de la poliproteína; dos copias exactas de un epítipo de la región de NS5 del VHC-1, cada una con los aminoácidos 2278 a 2313 de la poliproteína del VHC; y dos copias de un epítipo de la región del núcleo, una del VHC-1 y otra del VHC-2, copias que son determinantes antigénicos equivalentes representados por los aminoácidos 9 a 32, 39-42 y 64-88 del VHC-1 y 67-84 del VHC-2.

La tabla 5 muestra las posiciones de aminoácidos de los diversos epítipos con referencia a las figuras 8A a 8F en el presente documento (SEC ID N°: 5 y 6).

Tabla 5. MEFA 7.1				
Nº de aa de MEFA	Sitio de extremo en 5'	Epítipo	Nº de aa del VHC	Cepa
1-156	<i>Nco1</i>	hSOD		
159-176	<i>EcoR1</i>	E1	303-320	1
179-199	<i>Hind111</i>	Consenso de HVR1a de E2	390-410	1
200-230		Consenso de HVR1+2 de E2	384-414	1+2
231-696	<i>Sal1</i>	Helicasa	1193-1658	1
699-745	<i>Sph1</i>	5-1-1	1689-1735	1
748-794	<i>Nru1</i>	5-1-1	1689-1735	3
797-843	<i>Cla1</i>	5-1-1	1689-1735	2
846-881	<i>Ava1</i>	C100,	1901-1936	1
884-919	<i>Xba1</i>	NS5	2278-2313	1
922-957	<i>Bgl11</i>	NS5	2278-2313	1
958-1028	<i>Nco1</i>	epítipos del núcleo	9-32, 39-42 64-88 67-84	1 1 2
1029-1099	<i>Bal1</i>	epítipos del núcleo	9-32, 39-42, 64-88 67-84	1 1 2

En un formato de ensayo, se combina la muestra con el soporte sólido, tal como se describe más adelante adicionalmente. El soporte sólido incluye el antígeno del VHC aislado, tal como uno o más epítipos conformacionales de NS3/4a, o bien un MEFA tal como se describió anteriormente, incluyendo el MEFA uno o más epítipos derivados de la misma región de la poliproteína como el antígeno del VHC, tal como de la región NS3/4a. Tal como se explicó anteriormente, se conocen varios antígenos que incluyen tales epítipos, incluyendo, pero sin limitarse a antígenos derivados de las regiones c33c y c100, así como proteínas de fusión que comprenden un epítipo de NS3, tal como c25, y el determinante antigénico conocido como 5-1-1 que está parcialmente dentro de la región de NS4a (véase, la figura 1). Estos y otros epítipos de NS3/4a son útiles en los presentes ensayos y se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Houghton *et al.*, patente estadounidense número 5.350.671; Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien *et al.*, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:533-39; Chien *et al.*, publicación internacional número WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional número WO 94/01778; y patentes estadounidenses números 6.346.375 y 6.150.087.

Si la muestra está infectada por VHC, los anticuerpos frente al VHC para un epítipo presente en el soporte sólido se unirán a los componentes del soporte sólido. También se añade en la fase de disolución un antígeno marcado de manera detectable que también reacciona con el anticuerpo frente al VHC capturado de la muestra biológica. Por ejemplo, si el antígeno unido al soporte sólido es un epítipo conformacional de NS3/4a, el antígeno marcado de manera detectable usado en la fase de disolución es un MEFA que incluye un epítipo de NS3/4a. Si el antígeno unido al soporte sólido es un MEFA que incluye un epítipo de NS3/4a, el antígeno marcado de manera detectable usado en la fase de disolución incluye un epítipo conformacional de NS3/4a.

En la figura 2 se representa un ensayo representativo según la invención. Tal como se muestra en la figura, el soporte sólido incluye un epítipo conformacional de NS3/4a. Se añade la muestra biológica al soporte sólido. Los anticuerpos frente al VHC dirigidos contra el epítipo de NS3/4a presente en la muestra se unirán al epítipo conformacional de NS3/4a en el soporte sólido. Entonces se añade MEFA 12 marcado con peroxidasa del rábano blanco (HRP), que incluye un epítipo al que se unen los anticuerpos de la muestra. MEFA 12 se une al anticuerpo que también está unido mediante el epítipo conformacional de NS3/4a. Los componentes no unidos se eliminan por lavado y la detección del marcador indica la presencia de infección por VHC.

Los ensayos de tipo sándwich de antígeno/anticuerpo/antígeno descritos anteriormente son particularmente ventajosos ya que el uso de dos antígenos que se unen al anticuerpo de muestra permite el uso de mayores volúmenes de muestra. Adicionalmente, el ensayo puede completarse rápidamente.

Producción de antígenos para su uso en los inmunoensayos del VHC

Tal como se explicó anteriormente, las moléculas de la presente invención se producen generalmente de manera recombinante. Por tanto, pueden obtenerse polinucleótidos que codifican antígenos del VHC para su uso con la presente invención utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótido que codifican las moléculas descritas anteriormente pueden obtenerse usando procedimientos recombinantes, tales como mediante exploración en librerías genómicas y de ADNc a partir de células que expresan el gen, o mediante derivación del gen a partir de un vector que se sabe que incluye el mismo. Además, el gen deseado puede aislarse directamente de moléculas de ácido nucleico viral, usando técnicas descritas en la técnica, tal como en Houghton *et al.*, patente estadounidense número 5.350.671. El gen de interés también puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse. Las moléculas pueden diseñarse con codones apropiados para la secuencia particular. La secuencia completa se ensambla entonces a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante procedimientos convencionales y se ensamblan en una secuencia codificante completa. Véanse, por ejemplo, Edge (1981) *Nature* 292:756; Nambair *et al.* (1984) *Science* 223:1299; y Jay *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6311.

Por tanto, pueden obtenerse secuencias de nucleótidos particulares a partir de vectores que albergan las secuencias deseadas o pueden sintetizarse completamente o en parte usando diversas técnicas de síntesis de oligonucleótidos conocidas en la técnica, tales como técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuando sea apropiado. Véase, por ejemplo, Sambrook, citado anteriormente. En particular, un procedimiento de obtención de secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias deseadas es mediante la reasociación de conjuntos complementarios de oligonucleótidos sintéticos solapantes producidos en un sintetizador de polinucleótidos automático convencional, seguido por acoplamiento con una ADN ligasa apropiada y amplificación de la secuencia de nucleótidos acoplados mediante PVR. Véase, por ejemplo, Jayaraman *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4084-4088. Adicionalmente, puede usarse síntesis dirigida por oligonucleótidos (Jones *et al.* (1986) *Nature* 54:75-82), mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de regiones de nucleótidos pre-existentes (Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327 y Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), y rellenado enzimático de oligonucleótidos con huecos usando la ADN polimerasa de T4 (Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033) según la invención para proporcionar moléculas que tienen capacidades de unión a antígeno alteradas o mejoradas y/o inmunogenicidad reducida.

Una vez preparadas o aisladas las secuencias codificantes, tales secuencias pueden clonarse en cualquier vector o replicón adecuado. Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de clonación y la selección de un vector de clonación apropiado es cuestión de elección. Los vectores adecuados incluyen, pero sin limitarse a, plásmidos, fagos, transposones, cósmidos, cromosomas o virus que pueden replicarse cuando se asocian con los elementos de control apropiados.

Entonces se coloca la secuencia codificante bajo el control de elementos de control adecuados, dependiendo del sistema que va a usarse para la expresión. Por tanto, la secuencia codificante puede colocarse bajo el control de un promotor, sitio de unión a ribosomas (para la expresión en bacterias) y, opcionalmente, un operador, de modo que la secuencia de ADN de interés se transcribe en ARN mediante un transformante adecuado. La secuencia codificante puede contener o no un péptido señal o secuencia líder que puede eliminarse más tarde mediante el procesamiento post-traducciona en el huésped. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 4.431.739; 4.425.437; 4.338.397.

Además de las secuencias de control, podría ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión de las secuencias en relación con el crecimiento de la célula huésped. Los expertos en la técnica conocen las secuencias reguladoras y los ejemplos incluyen las que producen la expresión de un gen que va a activarse o desactivarse en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador.

También pueden estar presentes en el vector otros tipos de elementos reguladores. Por ejemplo, pueden usarse en el presente documento elementos de potenciador para aumentar los niveles de expresión de los constructos. Los ejemplos incluyen el potenciador del gen temprano de SV40 (Dijkema *et al.* (1985) EMBO J. 4:761), el potenciador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Gorman *et al.* (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777) y elementos derivados del CMV humano (Boshart *et al.* (1985) Cell 41:521), tales como elementos incluidos en la secuencia del intrón A del CMV (patente estadounidense número 5.688.688). El casete de expresión puede incluir además un origen de replicación para la replicación autónoma en una célula huésped adecuada, uno o más marcadores seleccionables, uno o más sitios de restricción, un potencial para un número de copias alto y un promotor fuerte.

Se construye un vector de expresión de modo que la secuencia codificante particular se ubica en el vector con las secuencias reguladoras, la colocación y la orientación de la secuencia codificante apropiadas con respecto a las secuencias de control que son tales que la secuencia codificante se transcribe bajo el "control" de las secuencias de control (es decir, la ARN polimerasa que se une a la molécula de ADN en las secuencias de control transcribe la secuencia codificante). Puede ser deseable la modificación de las secuencias que codifican la molécula de interés para lograr este fin. Por ejemplo, en algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de modo que pueda unirse a las secuencias de control en la orientación apropiada; es decir, para mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden acoplarse a la secuencia codificante antes de su inserción en un vector. Como alternativa, la secuencia codificante puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

Tal como se explicó anteriormente, puede ser deseable producir mutantes y análogos del antígeno de interés. Esto es particularmente cierto con NS3/4a. Los procedimientos para hacer esto se describen en, por ejemplo, Dasmahapatra *et al.*, patente estadounidense número 5.843.752 y Zhang *et al.*, patente estadounidense número 5.990.276. Pueden prepararse mutantes o análogos de esta y otras proteínas del VHC para su uso en los ensayos objeto mediante la delección de una parte de la secuencia que codifica el polipéptido de interés, mediante la inserción de una secuencia y/o mediante la sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para modificar las secuencias de nucleótidos, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y similares. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente; Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448; Geisselsoder *et al.* (1987) BioTechniques 5: 786; Zoller y Smith (1983) Methods Enzymol. 100:468; Dalbie-McFarland *et al.* (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409.

Las moléculas pueden expresarse en una amplia variedad de sistemas, incluyendo sistemas de expresión de insectos, mamíferos, bacterias, virus y levaduras, tal como se conoce bien en la técnica.

Por ejemplo, los expertos en la técnica conocen los sistemas de expresión de insectos, tales como los sistemas de baculovirus, y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Boletín N° 1555 (1987). Los materiales y procedimientos para los sistemas de expresión en células de baculovirus/insecto están comercialmente disponibles en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac"). De manera similar, los sistemas de expresión en células de hámster recién nacido (BHK), células de riñón de mono (COS), células de riñón embrionario humano, células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), así como otras. De manera similar, los huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp.*, encontrarán uso con los presentes constructos de expresión. Los huéspedes de levaduras útiles en la presente invención incluyen, entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Las células de insecto para su uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, entre otros, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.

También se conocen varias células huésped apropiadas para su uso con los sistemas anteriores. Por ejemplo, se conocen en la técnica líneas celulares de mamífero e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo Culture (ATCC), tal como, pero sin limitarse a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de riñón de mono (COS), células de riñón embrionario humano, células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), así como otras. De manera similar, los huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp.*, encontrarán uso con los presentes constructos de expresión. Los huéspedes de levaduras útiles en la presente invención incluyen, entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Las células de insecto para su uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, entre otros, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.

Las moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias de nucleótidos de interés pueden integrarse de manera estable en un genoma de célula huésped o pueden mantenerse en un elemento episomal estable en una célula huésped adecuada usando diversas técnicas de suministro de genes bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.399.346.

Dependiendo del sistema de expresión y del huésped seleccionados, las moléculas se producen haciendo crecer las células huésped transformadas mediante un vector de expresión descrito anteriormente en condiciones mediante las cuales se expresa la proteína. Entonces se aísla la proteína expresada de las células huésped y se purifica. Si el sistema de expresión secreta la proteína en los medios de crecimiento, el producto puede purificarse directamente de los medios. Si no se secreta, puede aislarse de los lisados celulares. La selección de las condiciones de crecimiento y los procedimientos de recuperación apropiados están dentro del conocimiento de la técnica.

Se ha descrito la producción recombinante de diversos antígenos del VHC. Véanse, por ejemplo, Houghton *et al.*, patente estadounidense número 5.350.671; Chien *et al.*, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33-39; Chien *et al.*, publicación internacional número WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional número WO 94/01778.

5 Ensayos de inmunodiagnóstico

Una vez producidos, los antígenos del VHC anteriores se colocan sobre un soporte sólido apropiado para su uso en los inmunoensayos objeto. Un soporte sólido, para los fines de esta invención, puede ser cualquier material que sea una matriz insoluble y puede tener una superficie rígida o semirrígida. Los soportes sólidos a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitarse a, sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de pocillo de microtitulación o membrana); poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, pocillos de microtitulación o láminas); látex de poliestireno (por ejemplo, placas de microtitulación o perlas); poli(fluoruro de vinilideno); papel diazotado; membranas de nailon; perlas activadas, perlas que responden magnéticamente y similares. Los soportes particulares incluyen placas, gránulos, discos, capilares, fibras huecas, agujas, pasadores, fibras sólidas, perlas de celulosa, perlas de vidrio poroso, geles de sílice, perlas de poliestireno opcionalmente reticulado con divinilbenceno, perlas de copolímero injertado, perlas de poliacrilamida, perlas de látex, perlas de dimetilacrilamida opcionalmente reticulada con N-N'-bis-acriloletilendiamina y partículas de vidrio revestidas con un polímero hidrófobo.

Si se desea, las moléculas que van a añadirse al soporte sólido pueden funcionalizarse fácilmente para crear restos de estireno o acrilato, permitiendo así la incorporación de las moléculas en poliestireno, poliácido o otros polímeros tales como poliimida, poliácido, polietileno, polivinilo, polidiacetileno, polifenilvinileno, polipéptido, polisacárido, polisulfona, polipirrol, poliimidazol, politiofeno, poliéter, resinas epoxídicas, vidrio de sílice, gel de sílice, siloxano, polifosfato, hidrogel, agarosa, celulosa y similares.

En un contexto, se hace reaccionar en primer lugar un soporte sólido con el antígeno del VHC aislado o bien con el MEFA (denominado "el componente de la fase sólida" en el presente documento), en condiciones de unión adecuadas de manera que las moléculas estén suficientemente inmovilizadas en el soporte. En ocasiones, la inmovilización en el soporte puede mejorarse acoplando en primer lugar el antígeno a una proteína con mejores propiedades de unión a la fase sólida. Las proteínas de acoplamiento adecuadas incluyen, pero sin limitarse a, macromoléculas tales como albúminas séricas incluyendo albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la técnica. Otros reactivos que pueden usarse para unir moléculas al soporte incluyen polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido y similares. Tales moléculas y procedimientos de acoplamiento de estas moléculas a los antígenos se conocen bien por los expertos habituales en la técnica. Véanse, por ejemplo, Brinkley, M.A. (1992) Bioconjugate Chem. 3:2-13; Hashida *et al.* (1984) J. Appl. Biochem. 6:56-63; y Anjaneyulu y Staros (1987) International J. of Peptide and Protein Res. 30:117-124.

Tras hacer reaccionar el soporte sólido con los componentes de la fase sólida, se eliminan los componentes de la fase sólida no inmovilizados del soporte mediante lavado y entonces se ponen en contacto los componentes unidos al soporte con una muestra biológica que se sospecha que contiene anticuerpos frente al VHC (denominadas "moléculas de ligando" en el presente documento) en condiciones de unión adecuadas. Tras lavar para eliminar cualquier molécula de ligando no unida, se añade un segundo antígeno del VHC (un antígeno del VHC aislado o bien el MEFA, dependiendo de qué antígeno esté unido al soporte sólido), en condiciones de unión adecuadas. Este segundo antígeno se denomina "componente de la fase de disolución" en el presente documento. El antígeno añadido incluye un marcador detectable, tal como se describió anteriormente, y se une a moléculas de ligando que han reaccionado con el antígeno unido al soporte. Por tanto, las moléculas de ligando se unen al componente de la fase sólida así como al componente de la fase de disolución. Las moléculas de ligando no unidas y los componentes de la fase de disolución se eliminan mediante lavado. Por tanto, la presencia de un marcador indica la presencia de anticuerpos frente al VHC en la muestra biológica.

Más particularmente, puede usarse un procedimiento de ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación están revestidos con los componentes de la fase sólida. Entonces se añade una muestra biológica que contiene o que se sospecha que contiene moléculas de ligando a los pocillos revestido. Tras un periodo de incubación suficiente para permitir la unión ligando-molécula al componente de la fase sólida inmovilizado, puede(n) lavarse la(s) placa(s) para eliminar los restos no unidos y se añade un componente de la fase de disolución marcado de manera detectable. Se permite que estas moléculas reaccionen con cualquier anticuerpo de muestra capturado, se lava la placa y se detecta la presencia del marcador usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Los reactivos de ensayo descritos anteriormente, incluyendo el soporte sólido de inmunoensayo con antígenos unidos, así como los antígenos que van a reaccionar con la muestra capturada, pueden proporcionarse en kits, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, con el fin de realizar inmunoensayos tal como se describió anteriormente. El kit también puede contener, dependiendo del inmunoensayo particular usado, marcadores adecuados y otros materiales y reactivos envasados (es decir, tampones de lavado y similares). Usando estos kits, pueden realizarse inmunoensayos convencionales, tales como los descritos anteriormente.

III. Parte experimental

A continuación se encuentran ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solamente para fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero debe permitirse, por supuesto, cierto error y desviación experimentales.

Ejemplo 1

Producción de un epítipo conformacional de NS3/4a con sustituciones de Thr por Pro y Ser por Ile

Se obtuvo un epítipo conformacional de NS3/4a tal como sigue. Este epítipo tiene la secuencia especificada en las figuras 3A a 3D (SEC ID N°: 1 y 2) y se diferencia de la secuencia nativa en las posiciones 403 (aminoácido 1428 de la secuencia de longitud completa del VHC-1) y 404 (aminoácido 1429 de la secuencia de longitud completa del VHC-1). De manera específica, la Thr que aparece de manera natural en la posición 1428 de la secuencia nativa se ha mutado a Pro y la Ser que aparece en la posición 1429 de la secuencia nativa se ha mutado a Ile.

En particular, el vector de expresión de levadura usado fue pBS24,1. Este vector de expresión de levadura contiene secuencias de 2μ y repeticiones invertidas (RI) para la replicación autónoma en levadura, el terminador de α -factor para garantizar la terminación de la transcripción, y los leu2-d y URA3 de levadura para la selección. El origen de replicación de ColE1 y el gen de β -lactamasa también están presentes para la propagación y selección en *E. coli* (Pichuantes *et al.* (1996) "Expression of Heterologous Gene Products in Yeast." En: Protein Engineering: A Guide to Design and Production, Capítulo 5. J. L. Cleland y C. Craik, eds., Wiley-Liss, Inc., Nueva York, N.Y. págs. 129-161).

Se produjo el plásmido pd.VHC1a.ns3ns4aPI, que codificada un epítipo de NS3/4a representativo usado en los inmunoensayos objeto, tal como sigue. Se usó un procedimiento de dos etapas. En primer lugar, se acoplaron entre sí las siguientes partes de ADN: (a) oligonucleótidos sintéticos que proporcionarían un sitio de clonación HindIII en el sentido 5', seguido de la secuencia ACAAACAAA (SEC ID N°: 8), el iniciador ATG, y codones para VHC-1a, comenzando con el aminoácido 1027 y continuando hasta un sitio BglII en el aminoácido 1046; (b) un fragmento de restricción BglII-ClaI de 683 pb (que codifica los aminoácidos 1046-1274) de pAChLTns3ns4aPI; y (c) un vector pSP72 (Promega, Madison; WI, número de acceso de GenBank/EMBL X65332) que se había digerido con HindIII y ClaI, desfosforilado y purificado en gel. Se derivó el plásmido pAChLTns3ns4aPI de pAChLT, un vector de expresión de baculovirus comercialmente disponible de BD Pharmingen (San Diego, CA). En particular, se preparó un vector de EcoRI-PstI pAChLT, así como los siguientes fragmentos: EcoRI-AlwNI, 935 pb, correspondiente a los aminoácidos 1027-1336 del genoma del VHC-1; AlwNI-SacII, 247 pb, correspondiente a los aminoácidos 1336-1419 del genoma del VHC-1; HinfI-BglII, 175 pb, correspondiente a los aminoácidos 1449-1509 del genoma del VHC-1; BglII-PstI, 619 pb, correspondiente a los aminoácidos 1510-1711 del genoma del VHC-1, más el codón de terminación de la transcripción. Se ligó un fragmento generado sintéticamente de SacII-HinfI de 91 pb, correspondiente a los aminoácidos 1420-1448 del genoma del VHC-1 y que contenía las mutaciones PI (Thr-1428 mutada a Pro, Ser-1429 mutada a Ile), con el fragmento de 175 pb de HinfI-BglII y el fragmento de 619 pb de BglII-PstI descritos anteriormente y subclonados en un vector pGEM-5Zf(+) digerido con SacII y PstI. pGEM-5Zf(+) es un vector de *E. coli* comercialmente disponible (Promega, Madison, WI, número de acceso de GenBank/EMBL X65308). Tras la transformación de células HB101 competentes, análisis de mini-selección de clones individuales y verificación de secuencia, se purificó en gel un fragmento de SacII-PstI de 885 pb a partir del gen 2 de pGEM5.PI. Se ligó este fragmento con el fragmento de 935 pb de EcoRI-AlwNI, el fragmento de 247 pb de AlwNI-SacII y el vector pAChLT de EcoRI-PstI, descritos anteriormente. El constructo resultante se denominó pAChLTns3ns4aPI.

Se transformó la mezcla de acoplamiento anterior en células competentes HB101 y se sembró en placa en placas de agar Luria que contenían ampicilina 100 μ g/ml. Los análisis Miniprep de los clones individuales condujeron a la identificación de supuestos positivos, dos de los cuales se amplificaron. El ADN del plásmido para pSP72 1aHC, clones n° 1 y n° 2 se prepararon con un kit Maxiprep de Qiagen y se secuenciaron.

A continuación, se acoplaron entre sí los siguientes fragmentos: (a) un fragmento de 761 pb de HindIII-ClaI a partir de pSP72 1aHC n° 1 (pSP72, 1aHC se generó acoplando entre sí lo siguiente: pSP72 que se había digerido con HindIII y ClaI, oligonucleótidos sintéticos que proporcionarían un sitio de clonación HindIII en el sentido de 5', seguido de la secuencia ACAAACAAA (SEC ID N°: 8), el codón de iniciación ATG, y codones para VHC1a, comenzando con el aminoácido 1027 y continuando hasta un sitio BglII en el aminoácido 1046, y un fragmento de restricción de 683 pb de BglII-ClaI (que codifica los aminoácidos 1046-1274) de pAChLTns3ns4aPI); (b) un fragmento de 1353 pb de BamHI-HindIII para el promotor híbrido de levadura ADH2/GAPDH; (c) un fragmento de 1320 pb de ClaI-SalI (que codifica los aminoácidos 1046-1711 de VHC1a con la Thr 1428 mutada a Pro y la Ser 1429 mutada a Ile) de pAChLTns3ns4aPI; y (d) el vector de expresión de levadura pBS24,1 que se había digerido con BamHI y SalI, desfosforilado y purificado en gel. Se transformó la mezcla de acoplamiento en HB 101 competentes y se sembró en placa en placas de agar Luria que contenían ampicilina 100 μ g/ml. Los análisis Miniprep de colonias individuales condujeron a la identificación de clones con el inserto de 3446 pb de BamHI-SalI esperado que estaba constituido por

ES 2 312 806 T3

el promotor ADH2/GAPDH, el codón iniciador ATG y NS3/4a de VHC1a de los aminoácidos 1027-1711 (mostrados como aminoácidos 1-686 de las figuras 3A-3D), con la Thr 1428 (posición de aminoácido 403 de las figuras 3A-3D) mutada a Pro y la Ser 1429 (posición de aminoácido 404 de las figuras 3A-3D) mutada a Ile. El constructo se denominó pd.VHC1a.ns3ns4aPI (véase la figura 4).

Se transformó la cepa AD3 de *S. cerevisiae* con pd.VHC1a.ns3ns4aPI y se examinaron transformantes individuales para determinar la expresión tras el agotamiento de glucosa en el medio. Se expresó la proteína recombinante a altos niveles en levadura, tal como se detecta mediante tinción con azul de Coomassie y se confirmó mediante análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo policlonal para el dominio helicasa de NS3.

Ejemplo 2

Purificación del epítipo conformacional de NS3/4a

Se purificó el epítipo conformacional de NS3/4a tal como sigue. Se recogieron células de *S. cerevisiae* de anteriormente, que expresan el epítipo de NS3/4a tal como se describió anteriormente. Se suspendieron las células en tampón de lisis (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 0,1 μ M, leupeptina 1 μ M) y se lisaron en un Dyno-Mill (Wab Willy A. Bachofen, Basilea, Suiza) o aparato equivalente usando perlas de vidrio, a una proporción de 1:1:1 células:tampón:perlas de vidrio de 0,5 mm. Se centrifugó el lisado a 30100 x g durante 30 min. a 4°C y se añadió el sedimento que contenía la fracción de proteína insoluble al tampón de lavado (6 ml/g de peso de sedimento celular inicial) y se sacudió a temperatura ambiente durante 15 min. El tampón de lavado estaba constituido por NaPO₄ 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M, β -mercaptoetanol 5 mM, glicerol al 10%, octilglucósido al 0,05%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 0,1 μ M, leupeptina 1 μ M. Se separó el residuo celular mediante centrifugación a 30100 x g durante 30 min. a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se conservó el sedimento.

Se extrajo proteína del sedimento tal como sigue. Se añadió tampón de extracción 6 ml/g y se sacudió a temperatura ambiente durante 15 min. El tampón de extracción estaba constituido por Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 1 M, β -mercaptoetanol 5 mM, glicerol al 10%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 0,1 μ M, leupeptina 1 μ M. Esto se centrifugó a 30100 x g durante 30 min. a 4°C. Se conservó el sobrenadante y se añadió sulfato de amonio hasta el 17,5% usando la siguiente fórmula: volumen de sobrenadante (ml) multiplicado por x% de sulfato de amonio/(1 - x% de sulfato de amonio) = ml de sulfato de amonio saturado 4,1 M para añadir al sobrenadante. Se añadió gota a gota el sulfato de amonio mientras se agitaba sobre hielo y se agitó la disolución sobre hielo 10 min. Se centrifugó la disolución a 17700 x g durante 30 min. a 4°C y se conservó el sedimento y se almacenó a de 2°C a 8°C durante hasta 48 horas.

Se resuspendió el sedimento y se hizo pasar en una columna Poly U (Poly U Sepharose 4B, Amersham Pharmacia) a 4°C tal como sigue. Se resuspendió el sedimento en 6 ml de tampón de equilibrio Poly U por gramo de peso de sedimento. El tampón de equilibrio estaba constituido por, HEPES 25 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, DTT 5 mM (añadido reciente), glicerol al 10%, 1,2 octilglucósido. Se sacudió la disolución 4°C durante 15 min. y se centrifugó a 31000 x g durante 30 min. a 4°C.

Se preparó una columna Poly U (1 ml de resina por gramo de peso de sedimento inicial). El caudal lineal era de 60 cm/h y el caudal de empaquetado era del 133% de 60 cm/h. Se equilibró la columna con tampón de equilibrio y se cargó el sobrenadante del sulfato de amonio resuspendido en la columna equilibrada. Se lavó la columna para el nivel inicial con el tampón de equilibrio y se eluyó la proteína con una etapa de elución en el siguiente tampón elución Poly U: HEPES 25 mM pH 8,0, NaCl 1 M, DTT 5 mM (añadido reciente), glicerol al 10%, 1,2 octilglucósido. Se hizo pasar el eluato de la columna en SDS-PAGE (teñido con Coomassie) y se congelaron alícuotas y se almacenaron a -80°C. Se confirmó la presencia del epítipo de NS3/4a mediante inmunotransferencia tipo Western, usando un anticuerpo policlonal dirigido frente al dominio de proteasa de NS3 y un anticuerpo monoclonal frente al epítipo 5-1-1 (VHC 4a).

Adicionalmente, se controló la actividad enzimática de proteasa durante la purificación tal como sigue. Se diluyeron un péptido NS4A (KKGSVVIVGRIVLSGKPAIPKK) (SEC ID N°: 9), y la muestra que contenía el epítipo conformacional de NS3/4a, en 90 μ l de tampón de reacción (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 0,15 M, EDTA 0,5 mM, glicerol al 10%, n-docecil-B-D-maltósido 0,05, DTT 5 mM) y se dejó mezclar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 90 μ l de la mezcla a una placa de microtitulación (Costar, Inc., Corning, NY) y se añadieron 10 μ l de sustrato de VHC (AnaSpec, Inc., San José CA). Se mezcló la placa y se leyó en un lector de placas Fluostar. Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia (URF) por minuto.

Usando estos procedimientos, el producto de la extracción con NaCl 1 M contenía una actividad de 3,7 URF/min., el precipitado de sulfato de amonio tenía una actividad de 7,5 URF/min. y el producto de la purificación Poly U tenía una actividad de 18,5 URF/min.

Ejemplo 3

Inmunorreactividad del epítipo conformacional de NS3/4a frente a NS3/4a desnaturalizada

La inmunorreactividad del epítipo conformacional de NS3/4a, producido tal como se describió anteriormente, se comparó con NS3/4a que se había desnaturalizado añadiéndole SDS a la preparación de epítipo conformacional de NS3/4a hasta una concentración final del 2%. Se revistieron NS3/4a desnaturalizada y NS3/4a conformacional sobre placas de microtitulación tal como se describió anteriormente. El antígeno c200 (Hepatology (1992) 15:19-25, disponible en sistema de prueba de ELISA ORTHO VHC Versión 3.0, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, Nueva Jersey) se revistió también sobre placas de microtitulación. Se usó el antígeno c200 como comparación, se supone que no es conformacional debido a la presencia de agente reductor (DTT) y detergente (SDS) en su formulación.

Se sometió a prueba la inmunorreactividad frente a dos paneles de seroconversión de VHC temprana, PHV 904 y PHV 914 (muestras de sangre humana comercialmente disponibles de Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA). Los resultados se muestran en la tabla 6. Los datos sugieren que la forma desnaturalizada o linealizada de NS3/4a (así como c200) no detecta paneles de seroconversión temprana tan pronto como el epítipo conformacional de NS3/4a.

TABLA 6

TABLA 6							
	NS3/4a frente a NS3/4a desnaturalizada						
	*Adición de 2% de SDS a la NS3/4a de reserva						
		NS3/4a	dNS3/4a *	c200	NS3/4a	dNS3/4a *	c200
		DO	DO	DO	s/co	s/co	s/co
VHC	PHV 904-1	0,012	0,012	0,009	0,02	0,02	0,01
Seroconver- siones	PHV 904-2	0,011	0,009	0,008	0,02	0,01	0,01
	PHV 904-3	1,124	0,071	0,045	1,80	0,11	0,07
	PHV 904-4	2,401	0,273	0,129	3,85	0,44	0,21
	PHV 904-5	3,022	0,793	0,347	4,85	1,28	0,57
	PHV 904-6	2,711	1,472	0,774	4,35	2,37	1,28
	PHV 904-7	3,294	1,860	0,943	5,28	2,99	1,55

TABLA 6

	NS3/4a frente a NS3/4a desnaturalizada						
	*Adición de 2% de SDS a la NS3/4a de reserva						
	PHV 914-1	0,006	0,004	0,001	0,01	0,01	0,00
	PHV 914-2	0,005	0,004	0,002	0,01	0,01	0,00
	PHV 914-3	0,098	0,003	0,001	0,16	0,00	0,00
	PHV 914-4	1,118	0,006	0,004	1,79	0,01	0,01
	PHV 914-5	2,035	0,044	0,022	3,26	0,07	0,04
	PHV 914-6	2,092	0,074	0,025	3,35	0,12	0,04
	PHV 914-7	2,519	0,281	0,132	4,04	0,45	0,22
	PHV 914-8	2,746	0,907	0,500	4,40	1,46	0,82
	PHV 914-9	3,084	1,730	0,931	4,94	2,78	1,53
VHC 3.0	Cont. neg.	0,023	0,024	0,008			
Controles	Cont. neg.	0,027	0,024	0,007			
	Cont. neg.	0,021	0,017	0,005			
	Promedio	0,024	0,022	0,007			
	Límite	0,624	0,622	0,607			

TABLA 6							
	NS3/4a frente a NS3/4a desnaturalizada						
	*Adición de 2% de SDS a la NS3/4a de reserva						
	Cont. pos.	1,239	0,903	0,575	1,99	1,45	0,95
	Cont. pos.	1,445	0,916	0,614	2,32	1,47	1,01

También se sometió a prueba la inmunorreactividad del epítipo conformacional usando anticuerpos monoclonales frente a NS3/4a, preparados usando procedimientos convencionales. Entonces se sometieron a prueba estos anticuerpos monoclonales en el formato de ELISA frente a NS3/4a y antígeno c200 y NS3/4a desnaturalizada. Los datos muestran que los anticuerpos monoclonales anti-NS3/4a reaccionan frente a la NS3/4a y NS3/4a desnaturalizada de manera similar a los paneles de seroconversión mostrados en la tabla 7. Este resultado proporciona también una evidencia adicional de que el NS3/4a es de naturaleza conformacional ya que pueden prepararse anticuerpos monoclonales que tienen reactividad similar a los paneles de seroconversión de c33c temprana.

Tabla 7				
		Placa		
		NS3/4a	dNS3/4a	c200
Anticuerpo monoclonal	DO	DO	DO	DO
4B9/E3	1:100	1,820	0,616	0,369
	1:1000	1,397	0,380	0,246
	1:10000	0,864	0,173	0,070
	1:20000	0,607	0,116	0,085
5B7/D7	1:100	2,885	0,898	0,436
	1:1000	2,866	0,541	0,267
	1:10000	1,672	0,215	0,086
	1:20000	1,053	0,124	0,059
1A8/H2	1:100	1,020	0,169	0,080
	1:1000	0,921	0,101	0,043
	1:10000	0,653	0,037	0,013
	1:20000	0,337	0,027	0,011

ES 2 312 806 T3

Ejemplo 4

Revestimiento de soporte sólido con los antígenos del VHC

5 Se reviste sobre placas el epítipo conformacional del VHC de antígeno NS3/4a o MEFA tal como sigue. Se filtra tampón de revestimiento de VHC (NaPO_4 50 mM pH 7,0, EDTA 2 mM y cloroacetamida al 0,1%) a través de una unidad de filtro de 0,22 μ . Entonces se añaden los siguientes reactivos secuencialmente al tampón de revestimiento de VHC y se agita después de cada adición: BSA-sulfhidrilo modificado 2 $\mu\text{g/ml}$, de una disolución 10 mg/ml (Bayer Corp. Pentex, Kankakee, Illinois); DTT 5 mM de una disolución 1 M (Sigma, St. Louis, MO); NS3/4a 0,45 $\mu\text{g/ml}$ (concentración de proteína de 0,3 mg/ml); o MEFA 7.1 0,375 $\mu\text{g/ml}$ (concentración de proteína de 1 mg/ml). Se agita la disolución final durante 15 minutos a temperatura ambiente.

15 Se añaden 200 μl de la disolución anterior a cada pocillo de una placa de fondo plano, de alta unión Costar (Corning Inc., Coming, Nueva York) y se incuban las placas durante la noche en una cámara de humedad. Entonces se lavan las placas con tampón de lavado (1 x PBS, TWEEN-20 al 0,1%), se secan con golpes suaves y se añaden 285 μl de tampón de post-revestimiento Ortho (1 x PBS, pH 7,4, BSA al 1%, sacarosa al 3%). Se incuban las placas durante al menos 1 hora, se golpean suavemente y se secan durante la noche 2-8°C. Las placas se embolsan con desecantes para su uso futuro.

20 Ejemplo 5

Inmunoensayos

25 Con el fin de someter a prueba la capacidad de los inmunoensayos objeto para detectar la infección por VHC, se usan paneles de muestras de sangre humana comercialmente disponibles que están infectados por VHC. Tales paneles están comercialmente disponibles de Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA (BBI); Bioclinical Partners, Franklin, MA (BCP); y North American Biologics, Inc., BocoRatan, FL (NABI).

30 Se realiza el ensayo tal como sigue. Se añaden 200 μl de tampón diluyente de muestra (caseína 1 g/l, SOD humana recombinante 100 mg/l, cloroacetamida 1 g/l, BSA 10 g/l, extracto de levadura 500 mg/l, EDTA 0,366 g/l, KPO_4 1,162 g/l, Tween-20 5 ml/l, NaCl 29,22 g/l, NaPO_4 1,627 g/l, SDS al 1%) a las placas revestidas. Entonces se añaden 20 μl de muestra. Esto se incuba a 37°C durante 30-60 minutos. Se lavan las placas con tampón de lavado (1 x PBS, pH 7,4, Tween-20 al 0,1%). Se añaden 200 μl del componente de fase de disolución marcado (MEFA marcado con HRP o bien epítipo conformacional de NS3/4a marcado con HRP, dependiendo del antígeno unido al soporte sólido), diluido 1:22.000 en el sistema de prueba de ELISA ORTHO VHC 3.0 con diluyente de conjugado en masa Enhanced SAVe (Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, Nueva Jersey) y se incuba durante 30-60 minutos a 37°C. Esto se lava como anteriormente, y se añaden 200 μl de disolución de sustrato (1 comprimido de OPD/10 ml). El comprimido de OPD contiene diclorhidrato de o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno para el desarrollo de color en la reacción de peroxidasas del rábano. Esto se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se detiene la reacción mediante la adición 50 μl de H_2SO_4 4 N y se leen las placas a 492 nm, en relación con la absorbancia a 690 nm como control.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de ensayo de tipo sándwich de antígeno-anticuerpo-antígeno de detección de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) proporcionar un soporte sólido de inmunoensayo que comprende antígenos del VHC unidos al mismo, en el que los antígenos del VHC están constituidos por uno o más antígenos aislados de una primera región de la poliproteína del VHC y en el que el uno o más antígenos aislados de la primera región de la poliproteína del VHC son uno o más epítopos conformacionales de NS3/4a aislados;

(b) combinar una muestra biológica con dicho soporte sólido en condiciones que permiten a los anticuerpos frente al VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a dicho uno o más antígenos del VHC;

(c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos un antígeno de fusión de múltiples epítopos del VHC (MEFA) marcado de manera detectable, en el que dicho MEFA marcado comprende al menos un epítipo de la región NS3/4a, en el que dicho MEFA se une a dicho anticuerpo frente al VHC unido;

(d) detectar los complejos formados entre dicho anticuerpo frente al VHC y dicho uno o más antígenos de la primera región de la poliproteína del VHC y dicho MEFA, si hay alguno, como indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho epítipo conformacional de NS3/4a comprende un epítipo de la región proteasa NS3/4a de la poliproteína del VHC.

3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho epítipo conformacional de NS3/4a comprende un epítipo de la región helicasa NS3/4a de la poliproteína del VHC.

4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho epítipo conformacional de NS3/4a comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 3A-3D (SEC ID N°: 2).

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho MEFA comprende un epítipo de la región proteasa NS3/4a de la poliproteína del VHC.

6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho MEFA comprende un epítipo de la región helicasa NS3/4a de la poliproteína del VHC.

7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho MEFA comprende aminoácidos numerados en relación con la secuencia del VHC-1.

8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho MEFA comprende un epítipo de la región c33c de la poliproteína del VHC.

9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho MEFA comprende los aminoácidos 1211-1457, numerados en relación con el VHC-1.

10. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho MEFA comprende los aminoácidos 1192-1457, numerados en relación con el VHC-1.

11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho MEFA comprende un epítipo de la región 5-1-1 de la poliproteína del VHC.

12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho MEFA comprende los aminoácidos 1689-1735, numerados en relación con el VHC-1.

13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho MEFA comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 6A-6F (SEC ID N°: 4).

14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho MEFA comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 8A-8F (SEC ID N°: 6).

15. Un procedimiento de ensayo de tipo sándwich de antígeno-anticuerpo-antígeno de detección de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) proporcionar un soporte sólido de inmunoensayo que comprende antígenos del VHC unidos al mismo, en el que los antígenos del VHC están constituidos por uno o más antígenos de fusión de múltiples epítopos (MEFA);

ES 2 312 806 T3

(b) combinar una muestra biológica con dicho soporte sólido en condiciones que permiten a los anticuerpos frente al VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a dicho uno o más MEFA;

5 (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos un antígeno del VHC aislado marcado de manera detectable de una región de la poliproteína del VHC presente en el uno o más MEFA, en el que el antígeno del VHC aislado es un epítipo conformacional de NS3/4a aislado y el MEFA comprende al menos un epítipo de la región NS3/4a, en el que dicho antígeno aislado se une a dicho anticuerpo frente al VHC unido;

10 (d) detectar los complejos formados entre dicho anticuerpo frente al VHC y dicho antígeno del VHC aislado y dicho MEFA, si hay alguno, como indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho epítipo conformacional de NS3/4a comprende un epítipo de la región proteasa NS3/4a de la poliproteína del VHC.

15 17. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho epítipo conformacional de NS3/4a comprende un epítipo de la región helicasa NS3/4a de la poliproteína del VHC.

20 18. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho epítipo conformacional de NS3/4a comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 3A-3D (SEC ID N°: 2).

19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que dicho MEFA comprende un epítipo de la región proteasa NS3/4a de la poliproteína del VHC.

25 20. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que dicho MEFA comprende un epítipo de la región helicasa NS3/4a de la poliproteína del VHC.

21. El procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicho MEFA comprende los aminoácidos 1193-1657, numerados en relación con la secuencia del VHC-1.

30 22. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que dicho MEFA comprende un epítipo de la región c33c de la poliproteína del VHC.

35 23. El procedimiento según la reivindicación 22, en el que dicho MEFA comprende los aminoácidos 1211-1457, numerados en relación con el VHC-1.

24. El procedimiento según la reivindicación 22, en el que dicho MEFA comprende los aminoácidos 1192-1457, numerados en relación con el VHC-1.

40 25. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que dicho MEFA comprende un epítipo de la región 5-1-1 de la poliproteína del VHC.

26. El procedimiento según la reivindicación 25, en el que dicho MEFA comprende los aminoácidos 1689-1735, numerados en relación con el VHC-1.

45 27. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que dichos MEFA comprenden la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 6A-6F (SEC ID N°: 4).

50 28. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que dicho MEFA comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 8A-8F (SEC ID N°: 6).

55 29. Uso de un soporte sólido de inmunoensayo que comprende antígenos del VHC unidos al mismo y un MEFA del VHC marcado de manera detectable en un procedimiento para detectar la infección por VHC en una muestra biológica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que los antígenos del VHC están constituidos por uno o más antígenos aislados de una primera región de la poliproteína del VHC, y el MEFA marcado comprende al menos un epítipo de la misma región de la poliproteína del VHC como el uno o más antígenos aislados.

60 30. Uso de un soporte sólido de inmunoensayo que comprende antígenos del VHC unidos al mismo y un antígeno del VHC aislado marcado de manera detectable en un procedimiento para detectar la infección por VHC en una muestra biológica según una cualquiera de las reivindicaciones 15-28, en el que los antígenos del VHC están constituidos por uno o más MEFA, y el antígeno del VHC aislado marcado es de una región de la poliproteína del VHC presente en el uno o más MEFA.

Proteínas recombinantes y genoma del VHC

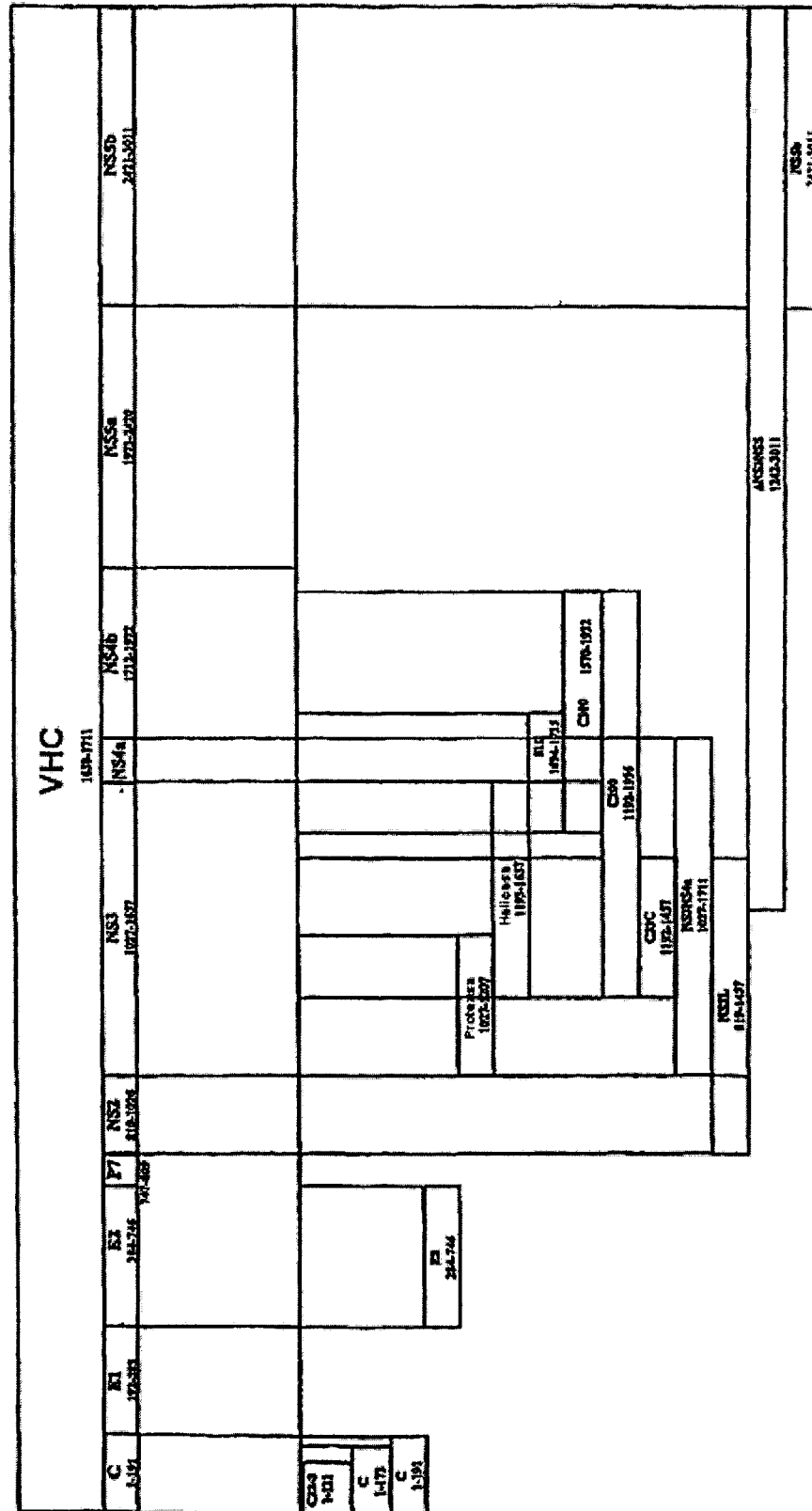


FIG. 1

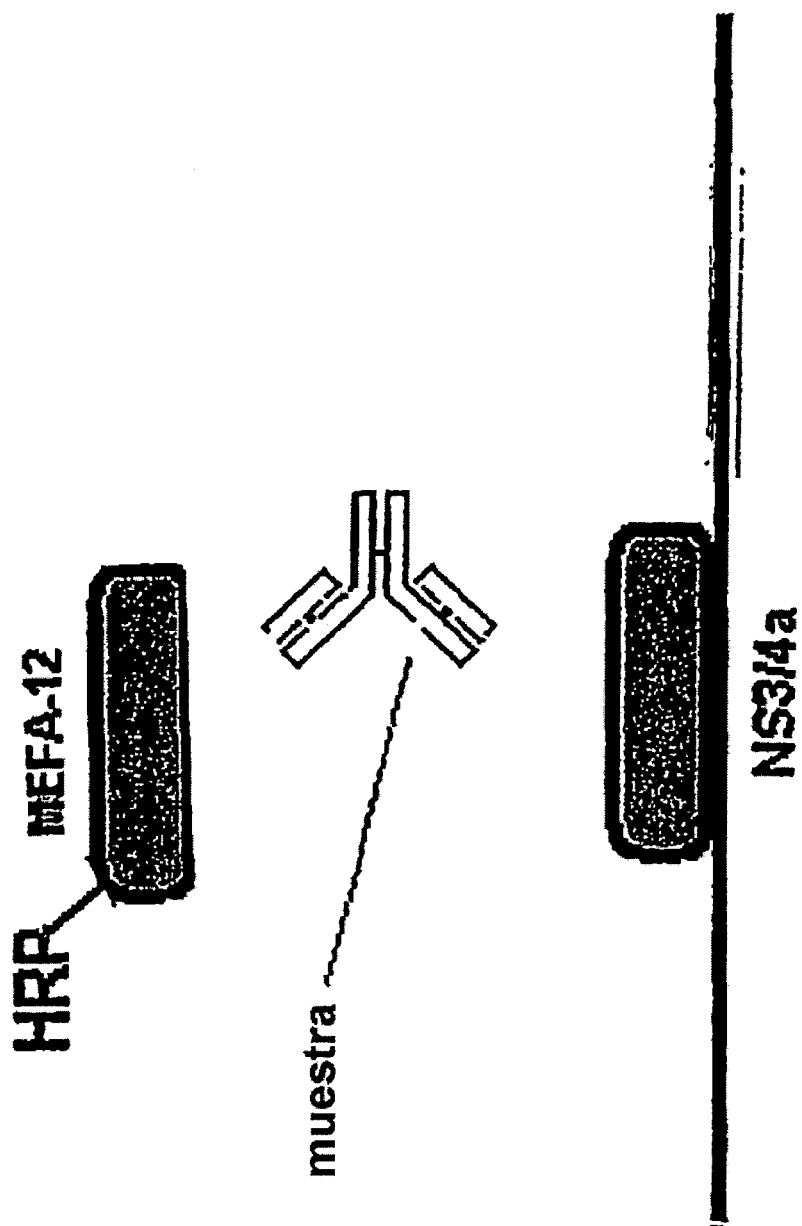


FIG. 2

					1										10
					M	A	P	I	T	A	Y	A	Q	Q	
					ATG	GCG	CCC	ATC	ACG	GCG	TAC	GCC	CAG	CAG	
									20						
T	R	G	L	L	G	C	I	I	T	S	L	T	G	R	
ACA	AGG	GGC	CTC	CTA	GGG	TGC	ATA	ATC	ACC	AGC	CTA	ACT	GGC	CGG	
				30											40
D	K	N	Q	V	E	G	E	V	Q	I	V	S	T	A	
GAC	AAA	AAC	CAA	GTG	GAG	GGT	GAG	GTC	CAG	ATT	GTG	TCA	ACT	GCT	
									50						
A	Q	T	F	L	A	T	C	I	N	G	V	C	W	T	
GCC	CAA	ACC	TTC	CTG	GCA	ACG	TGC	ATC	AAT	GGG	GTG	TGC	TGG	ACT	
				60											70
V	Y	H	G	A	G	T	R	T	I	A	S	P	K	G	
GTC	TAC	CAC	GGG	GCC	GGA	ACG	AGG	ACC	ATC	GCG	TCA	CCC	AAG	GGT	
									80						
P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	
CCT	GTC	ATC	CAG	ATG	TAT	ACC	AAT	GTA	GAC	CAA	GAC	CTT	GTG	GGC	
				90											100
W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	
TGG	CCC	GCT	CCG	CAA	GGT	AGC	CGA	TCA	TTG	ACA	CCC	TGC	ACT	TGC	
									110						
G	S	S	D	L	Y	L	V	T	R	H	A	D	V	I	
GGC	TCC	TCG	GAC	CTT	TAC	CTG	GTC	ACG	AGG	CAC	GCC	GAT	GTC	ATT	
				120											130
P	V	R	R	R	G	D	S	R	G	S	L	L	S	P	
CCC	GTG	CGC	CGG	CGG	GGT	GAT	AGC	AGG	GGC	AGC	CTG	CTG	TCG	CCC	
									140						
R	P	I	S	Y	L	K	G	S	S	G	G	P	L	L	
CGG	CCC	ATT	TCC	TAC	TTG	AAA	GGC	TCC	TCG	GGG	GGT	CCG	CTG	TTG	
				150											160
C	P	A	G	H	A	V	G	I	F	R	A	A	V	C	
TGC	CCC	GCG	GGG	CAC	GCC	GTG	GGC	ATA	TTT	AGG	GCC	GCG	GTG	TGC	
									170						
T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	I	P	V	E	N	
ACC	CGT	GGA	GTG	GCT	AAG	GCG	GTG	GAC	TTT	ATC	CCT	GTG	GAG	AAC	
				180											190
L	E	T	T												

FIG. 3A

ES 2 312 806 T3

200
 P P V V P Q S F Q V A H L H A
 CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT
 210
 P T G S G K S T K V P A A Y A 220
 CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA
 230
 A Q G Y K V L V L N P S V A A
 GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA
 240
 T L G F G A Y M S K A H G I D 250
 ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT
 260
 P N I R T G V R T I T T G S P
 CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC
 270
 I T Y S T Y G K F L A D G G C 280
 ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC
 290
 S G G A Y D I I I C D E C H S
 TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC
 300
 T D A T S I L G I G T V L D Q 310
 ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA
 320
 A E T A G A R L V V L A T A T
 GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC
 330
 P P G S V T V P H P N I E E V 340
 CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT
 350
 A L S T T G E I P F Y G K A I
 GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC
 360
 P L E V I K G G R H L I F C H 370
 CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT
 380
 S K K K C D E L A A K L V A L
 TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG

FIG. 3B

ES 2 312 806 T3

				390										400
G	I	N	A	V	A	Y	Y	R	G	L	D	V	S	V
GGC	ATC	AAT	GCC	GTG	GCC	TAC	TAC	CGC	GGT	CTT	GAC	GTG	TCC	GTC
									410					
I	P	P	I	G	D	V	V	V	V	A	T	D	A	L
ATC	CCG	CCC	ATC	GGC	GAT	GTT	GTC	GTC	GTG	GCA	ACC	GAT	GCC	CTC
				420										430
M	T	G	Y	T	G	D	F	D	S	V	I	D	C	N
ATG	ACC	GGC	TAT	ACG	GGC	GAC	TTC	GAC	TCG	GTG	ATA	GAC	TGC	AAT
									440					
T	C	V	T	Q	T	V	D	F	S	L	D	P	T	F
ACG	TGT	GTC	ACC	CAG	ACA	GTC	GAT	TTC	AGC	CTT	GAC	CCT	ACC	TTC
				450										460
T	I	E	T	I	T	L	P	Q	D	A	V	S	R	T
ACC	ATT	GAG	ACA	ATC	ACG	CTC	CCC	CAA	GAT	GCT	GTC	TCC	CGC	ACT
									470					
Q	R	R	G	R	T	G	R	G	K	P	G	I	Y	R
CAA	CGT	CGG	GGC	AGG	ACT	GGC	AGG	GGG	AAG	CCA	GGC	ATC	TAC	AGA
				480										490
F	V	A	P	G	E	R	P	S	G	M	F	D	S	S
TTT	GTG	GCA	CCG	GGG	GAG	CGC	CCC	TCC	GGC	ATG	TTC	GAC	TCG	TCC
									500					
V	L	C	E	C	Y	D	A	G	C	A	W	Y	E	L
GTC	CTC	TGT	GAG	TGC	TAT	GAC	GCA	GGC	TGT	GCT	TGG	TAT	GAG	CTC
				510										520
T	P	A	E	T	T	V	R	L	R	A	Y	M	N	T
ACG	CCC	GCC	GAG	ACT	ACA	GTT	AGG	CTA	CGA	GCG	TAC	ATG	AAC	ACC
									530					
P	G	L	P	V	C	Q	D	H	L	E	F	W	E	G
CCG	GGG	CTT	CCC	GTG	TGC	CAG	GAC	CAT	CTT	GAA	TTT	TGG	GAG	GGC
				540										550
V	F	T	G	L	T	H	I	D	A	H	F	L	S	Q
GTC	TTT	ACA	GGC	CTC	ACT	CAT	ATA	GAT	GCC	CAC	TTT	CTA	TCC	CAG
									560					
T	K	Q	S	G	E	N	L	P	Y	L	V	A	Y	Q
ACA	AAG	CAG	AGT	GGG	GAG	AAC	CTT	CCT	TAC	CTG	GTA	GCG	TAC	CAA
				570										580
A	T	V	C	A	R	A	Q	A	P	P	P	S	W	D
GCC	ACC	GTG	TGC	GCT	AGG	GCT	CAA	GCC	CCT	CCC	CCA	TCG	TGG	GAC

FIG. 3C

590
 Q M W K C L I R L K P T L H G
 CAG ATG TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG
 600
 P T P L L Y R L G A V Q N E I 610
 CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC
 620
 T L T H P V T K Y I M T C M S
 ACC CTG ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG
 630
 A D L E V V T S T W V L V G G 640
 GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG GTG CTC GTT GGC GGC
 650
 V L A A L A A Y C L S T G C V
 GTC CTG GCT GCT TTG GCC GCG TAT TGC CTG TCA ACA GGC TGC GTG
 660
 V I V G R V V L S G K P A I I 670
 GTC ATA GTG GGC AGG GTC GTC TTG TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA
 680
 P D R E V L Y R E F D E M E E
 CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG
 686
 C
 TGC

FIG. 3D

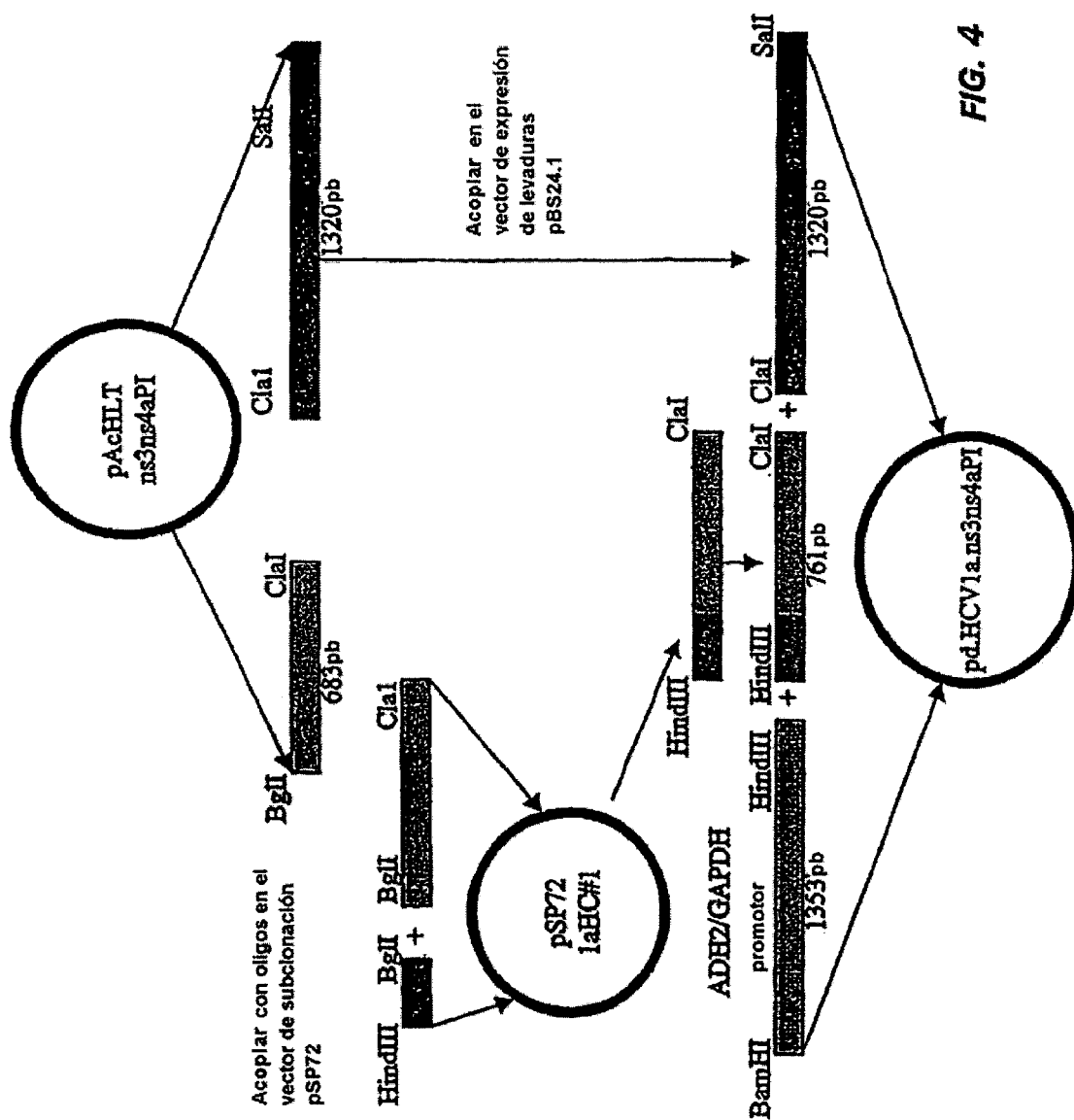


FIG. 4

Construto de antígeno MEFA 12

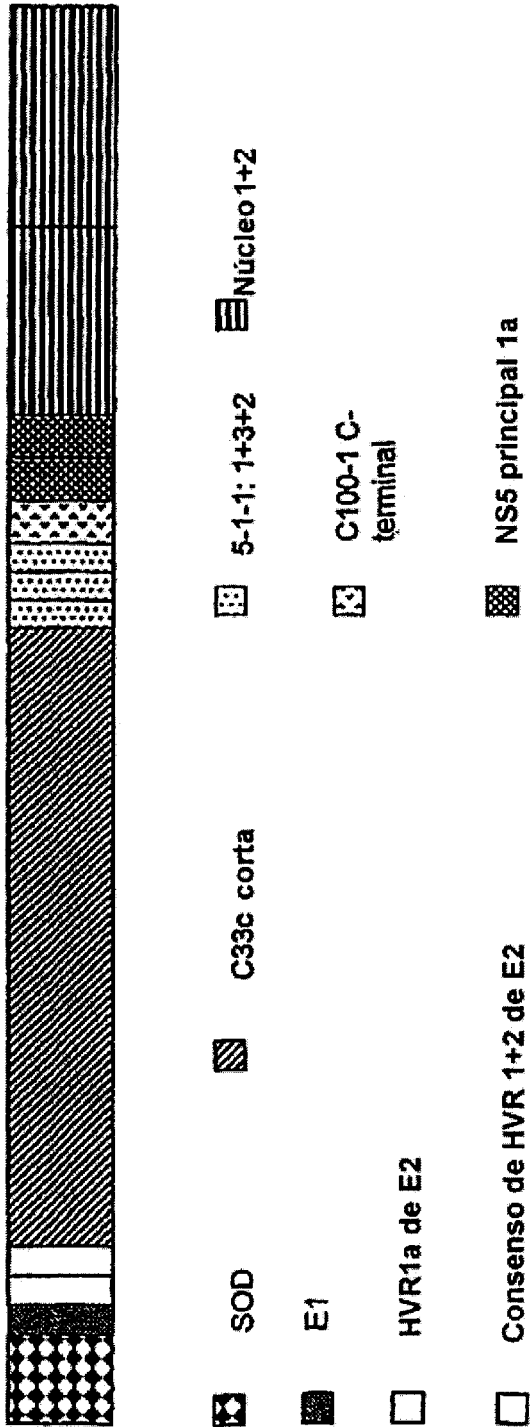


FIG. 5

ES 2 312 806 T3

1	M	A	T	K	A	V	C	V	L	10	K	G	D	G	P	V	
	ATG	GCT	ACA	AAG	GCT	GTT	TGT	GTT	TTG		AAG	GGT	GAC	GGC	CCA	GTT	45
					20											30	
	Q	G	I	I	N	F	E	Q	K		E	S	N	G	P	V	90
	CAA	GGT	ATT	ATT	AAC	TTC	GAG	CAG	AAG		GAA	AGT	AAT	GGA	CCA	GTG	
										40							
	K	V	W	G	S	I	K	G	L		T	E	G	L	H	G	
	AAG	GTG	TGG	GGA	AGC	ATT	AAA	GGA	CTG		ACT	GAA	GGC	CTG	CAT	GGA	135
					50											60	
	F	H	V	H	E	F	G	D	N		T	A	G	C	T	S	
	TTC	CAT	GTT	CAT	GAG	TTT	GGA	GAT	AAT		ACA	GCA	GGC	TGT	ACC	AGT	180
										70							
	A	G	P	H	F	N	P	L	S		T	R	G	C	N	C	
	GCA	GGT	CCT	CAC	TTT	AAT	CCT	CTA	TCC		ACG	CGT	GGT	TGC	AAT	TGC	225
					80											90	
	S	I	Y	P	G	H	I	T	G		H	R	M	A	W	K	
	TCT	ATC	TAT	CCC	GGC	CAT	ATA	ACG	GGT		CAC	CGC	ATG	GCA	TGG	AAG	270
										100							
	L	G	S	A	A	R	T	T	S		G	F	V	S	L	F	
	CTT	GGT	TCC	GCC	GCC	AGA	ACT	ACC	TCG		GGC	TTT	GTC	TCC	TTG	TTC	315
					110											120	
	A	P	G	A	K	Q	N	E	T		H	V	T	G	G	A	
	GCC	CCA	GGT	GCC	AAA	CAA	AAC	GAA	ACT		CAC	GTC	ACG	GGA	GGC	GCA	360
										130							
	A	A	R	T	T	S	G	L	T		S	L	F	S	P	G	
	GCC	GCC	CGA	ACT	ACG	TCT	GGG	TTG	ACC		TCT	TTG	TTC	TCC	CCA	GGT	405

FIG. 6A

ES 2 312 806 T3

140														150
A	S	Q	N	I	Q	L	I	T	S	T	D	N	S	S
GCC	AGC	CAA	AAC	ATT	CAA	TTG	ATT	ACT	AGT	ACG	GAT	AAC	TCC	TCT
														450
160														
P	P	V	V	P	Q	S	F	Q	V	A	H	L	H	A
CCA	CCA	GTA	GTG	CCC	CAG	AGC	TTC	CAG	GTG	GCT	CAC	CTC	CAT	GCT
														495
170														180
P	T	G	S	G	K	S	T	K	V	P	A	A	Y	A
CCC	ACA	GGC	AGC	GGC	AAA	AGC	ACC	AAG	GTC	CCG	GCT	GCA	TAT	GCA
														540
190														
A	Q	G	Y	K	V	L	V	L	N	P	S	V	A	A
GCT	CAG	GGC	TAT	AAG	GTG	CTA	GTA	CTC	AAC	CCC	TCT	GTT	GCT	GCA
														585
200														210
T	L	G	F	G	A	Y	M	S	K	A	H	G	I	D
ACA	CTG	GGC	TTT	GGT	GCT	TAC	ATG	TCC	AAG	GCT	CAT	GGG	ATC	GAT
														630
220														
P	N	I	R	T	G	V	R	T	I	T	T	G	S	P
CCT	AAC	ATC	AGG	ACC	GGG	GTG	AGA	ACA	ATT	ACC	ACT	GGC	AGC	CCC
														675
230														240
I	T	Y	S	T	Y	G	K	F	L	A	D	G	G	C
ATC	ACG	TAC	TCC	ACC	TAC	GGC	AAG	TTC	CTT	GCC	GAC	GGC	GGG	TGC
														720
250														
S	G	G	A	Y	D	I	I	I	C	D	E	C	H	S
TCG	GGG	GGC	GCT	TAT	GAC	ATA	ATA	ATT	TGT	GAC	GAG	TGC	CAC	TCC
														765
260														270
T	D	A	T	S	I	L	G	I	G	T	V	L	D	Q
ACG	GAT	GCC	ACA	TCC	ATC	TTG	GGC	ATC	GGC	ACT	GTC	CTT	GAC	CAA
														810
280														
A	E	T	A	G	A	R	L	V	V	L	A	T	A	T
GCA	GAG	ACT	GCG	GGG	GCG	AGA	CTG	GTT	GTG	CTC	GCC	ACC	GCC	ACC
														855
290														300
P	P	G	S	V	T	V	P	H	P	N	I	E	E	V
CCT	CCG	GGC	TCC	GTC	ACT	GTG	CCC	CAT	CCC	AAC	ATC	GAG	GAG	GTT
														900

FIG. 6B

```

                                310
    A   L   S   T   T   G   E   I   P   F   Y   G   K   A   I
GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC 945

                                320
    P   L   E   V   I   K   G   G   R   H   L   I   F   C   H
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT 990

                                340
    S   K   K   K   C   D   E   L   A   A   K   L   V   A   L
TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG 1035

                                350
    G   I   N   A   V   A   Y   Y   R   G   L   D   V   S   V
GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC 1080

                                370
    I   P   T   S   G   D   V   V   V   V   A   T   D   A   L
ATC CCG ACC AGC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC 1125

                                380
    M   T   G   Y   T   G   D   F   D   S   V   I   D   C   N
ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT 1170

                                400
    T   C   A   C   S   G   K   P   A   I   I   P   D   R   E
ACG TGT GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA CCT GAC AGG GAA 1215

                                410
    V   L   Y   R   E   F   D   E   M   E   E   C   S   Q   H
GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG TGC TCT CAG CAC 1260

                                430
    L   P   Y   I   E   Q   G   M   M   L   A   E   Q   F   K
TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC GAG CAG TTC AAG 1305

                                440
    Q   K   A   L   G   L   S   R   G   G   K   P   A   I   V
CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG CCG GCA ATC GTT 1350

                                460
    P   D   K   E   V   L   Y   Q   Q   Y   D   E   M   E   E
CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT GAG ATG GAA GAG 1395

```

FIG. 6C

ES 2 312 806 T3

C	S	Q	A	A	P	Y	I	E	Q	A	Q	V	I	A	470	
TGC	TCA	CAA	GCT	GCC	CCA	TAT	ATC	GAA	CAA	GCT	CAG	GTA	ATA	GCT	1440	
H	Q	F	K	E	K	V	L	G	L	I	D	N	D	Q	480	
CAC	CAG	TTC	AAG	GAA	AAA	GTC	CTT	GGA	TTG	ATC	GAT	AAT	GAT	CAA	1485	
V	V	V	T	P	D	K	E	I	L	Y	E	A	F	D	510	
GTG	GTT	GTG	ACT	CCT	GAC	AAA	GAA	ATC	TTA	TAT	GAG	GCC	TTT	GAT	1530	
E	M	E	E	C	A	S	K	A	A	L	I	E	E	G	520	
GAG	ATG	GAA	GAA	TGC	GCC	TCC	AAA	GCC	GCC	CTC	ATT	GAG	GAA	GGG	1575	
Q	R	M	A	E	M	L	K	S	K	I	Q	G	L	L	540	
CAG	CGG	ATG	GCG	GAG	ATG	CTC	AAG	TCT	AAG	ATA	CAA	GGC	CTC	CTC	1620	
G	I	L	R	R	H	V	G	P	G	E	G	A	V	Q	550	
GGG	ATA	CTG	CGC	CGG	CAC	GTT	GGT	CCT	GGC	GAG	GGG	GCA	GTG	CAG	1665	
W	M	N	R	L	I	A	F	A	S	R	G	N	H	V	570	
TGG	ATG	AAC	CGG	CTG	ATA	GCC	TTC	GCC	TCC	AGA	GGG	AAC	CAT	GTT	1710	
S	P	T	H	Y	V	P	S	R	S	R	R	F	A	Q	580	
TCC	CCC	ACG	CAC	TAC	GTT	CCG	TCT	AGA	TCC	CGG	AGA	TTC	GCC	CAG	1755	
A	L	P	V	W	A	R	P	D	Y	N	P	P	L	V	600	
GCC	CTG	CCC	GTT	TGG	GCG	CGG	CCG	GAC	TAT	AAC	CCC	CCG	CTA	GTG	1800	
E	T	W	K	K	P	D	Y	E	P	P	V	V	H	G	610	
GAG	ACG	TGG	AAA	AAG	CCC	GAC	TAC	GAA	CCA	CCT	GTG	GTC	CAC	GGC	1845	
R	S	S	R	R	F	A	Q	A	L	P	V	W	A	R	620	
AGA	TCT	TCT	CGG	AGA	TTC	GCC	CAG	GCC	CTG	CCC	GTT	TGG	GCG	CGG	1890	

FIG. 6D

P	D	Y	N	P	P	L	V	E	640	T	W	K	K	P	D	
CCG	GAC	TAT	AAC	CCC	CCG	CTA	GTG	GAG	ACG	TGG	AAA	AAG	CCC	GAC	1935	
				650											660	
Y	E	P	P	V	V	H	G	R	K	T	K	R	N	T		
TAC	GAA	CCA	CCT	GTG	GTC	CAT	GGC	AGA	AAG	ACC	AAA	CGT	AAC	ACC	1980	
									670							
N	R	R	P	Q	D	V	K	F	P	G	G	G	Q	I		
AAC	CGG	CGG	CCG	CAG	GAC	GTC	AAG	TTC	CCG	GGT	GGC	GGT	CAG	ATC	2025	
				680											690	
V	G	G	V	Y	L	L	P	R	R	G	P	R	L	G		
GTT	GGT	GGA	GTT	TAC	TTG	TTG	CCG	CGC	AGG	GGC	CCT	AGA	TTG	GGT	2070	
									700							
V	L	A	T	R	K	T	S	P	I	P	K	A	R	R		
GTG	CTC	GCG	ACG	AGA	AAG	ACT	TCC	CCT	ATC	CCC	AAG	GCT	CGT	CGG	2115	
				710											720	
P	E	G	R	T	W	A	Q	P	G	Y	P	W	P	L		
CCC	GAG	GGC	AGG	ACC	TGG	GCT	CAG	CCC	GGT	TAC	CCT	TGG	CCC	CTC	2160	
									730							
Y	G	N	K	D	R	R	S	T	G	K	S	W	G	K		
TAT	GGC	AAT	AAG	GAC	AGA	CGG	TCT	ACA	GGT	AAG	TCC	TGG	GGT	AAG	2205	
				740											750	
P	G	Y	P	W	P	R	K	T	K	R	N	T	N	R		
CCA	GGG	TAC	CCT	TGG	CCA	AGA	AAG	ACC	AAA	CGT	AAC	ACC	AAC	CGG	2250	
									760							
R	P	Q	D	V	K	F	P	G	G	G	Q	I	V	G		
CGG	CCG	CAG	GAC	GTC	AAG	TTC	CCG	GGT	GGC	GGT	CAG	ATC	GTT	GGT	2295	
				770											780	
G	V	Y	L	L	P	R	R	G	P	R	L	G	V	L		
GGA	GTT	TAC	TTG	TTG	CCG	CGC	AGG	GGC	CCT	AGA	TTG	GGT	GTG	CTC	2340	
									790							
A	T	R	K	T	S	P	I	P	K	A	R	R	P	E		
GCG	ACG	AGA	AAG	ACT	TCC	CCT	ATC	CCC	AAG	GCT	CGT	CGG	CCC	GAG	2385	

FIG. 6E

ES 2 312 806 T3

				800										810	
G	R	T	W	A	Q	P	G	Y	P	W	P	L	Y	G	
GGC	AGG	ACC	TGG	GCT	CAG	CCC	GGT	TAC	CCT	TGG	CCC	CTC	TAT	GGC	2430
									820						
N	K	D	R	R	S	T	G	K	S	W	G	K	P	G	
AAT	AAG	GAC	AGA	CGG	TCT	ACA	GGT	AAG	TCC	TGG	GGT	AAG	CCA	GGG	2475
				829											
Y	P	W	P	OC											
TAC	CCT	TGG	CCC	TAA	TGAGTCGAC										

FIG. 6F

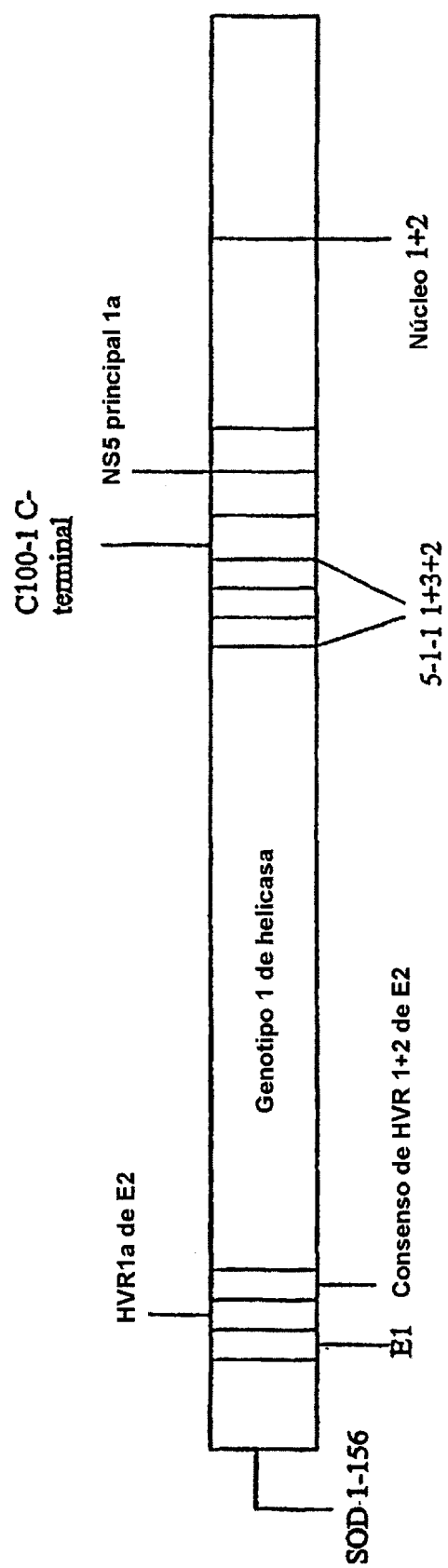


FIG. 7

ES 2 312 806 T3

```

      1                               10
M   A   T   K   A   V   C   V   L   K   G   D   G   P   V
ATG GCT ACA AAG GCT GTT TGT GTT TTG AAG GGT GAC GGC CCA GTT

      20                               30
Q   G   I   I   N   F   E   Q   K   E   S   N   G   P   V
CAA GGT ATT ATT AAC TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG

      40
K   V   W   G   S   I   K   G   L   T   E   G   L   H   G
AAG GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA

      50                               60
F   H   V   H   E   F   G   D   N   T   A   G   C   T   S
TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT

      70
A   G   P   H   F   N   P   L   S   R   K   H   G   G   P
GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC AGA AAA CAC GGT GGG CCA

      80                               90
K   D   E   E   R   H   V   G   D   L   G   N   V   T   A
AAG GAT GAA GAG AGG CAT GTT GGA GAC TTG GGC AAT GTG ACT GCT

      100
D   K   D   G   V   A   D   V   S   I   E   D   S   V   I
GAC AAA GAT GGT GTG GCC GAT GTG TCT ATT GAA GAT TCT GTG ATC

      110                               120
S   L   S   G   D   H   C   I   I   G   R   T   L   V   V
TCA CTC TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT GGC GGC ACA CTG GTG GTC

      130
H   E   K   A   D   D   L   G   K   G   G   N   E   E   S
CAT GAA AAA GCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT GGA AAT GAA GAA AGT

      140                               150
T   K   T   G   N   A   G   S   R   L   A   C   G   V   I
ACA AAG ACA GGA AAC GCT GGA AGT CGT TTG GCT TGT GGT GTA ATT

      160
G   I   A   Q   N   L   N   S   G   C   N   C   S   I   Y
GGG ATC GCC CAG AAT TTG AAT TCT GGT TGC AAT TGC TCT ATC TAT

      170                               180
P   G   H   I   T   G   H   R   M   A   W   K   L   G   S
CCC GGC CAT ATA ACG GGT CAC CGC ATG GCA TGG AAG CTT GGT TCC

      190
A   A   R   T   T   S   G   F   V   S   L   F   A   P   G
GCC GCC AGA ACT ACC TCG GGC TTT GTC TCC TTG TTC GCC CCA GGT

```

FIG. 8A

ES 2 312 806 T3

```

                200
A   K   Q   N   E   T   H   V   T   G   G   A   A   A   R
GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA GCC GCC CGA

                220
T   T   S   G   L   T   S   L   F   S   P   G   A   S   Q
ACT ACG TCT GGG TTG ACC TCT TTG TTC TCC CCA GGT GCC AGC CAA

                230
N   I   Q   L   I   V   D   F   I   P   V   E   N   L   E
AAC ATT CAA TTG ATT GTC GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC CTA GAG

                250
T   T   M   R   S   P   V   F   T   D   N   S   S   P   P
ACA ACC ATG CGA TCT CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA

                260
V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A   P   T
GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA

                280
G   S   G   K   S   T   K   V   P   A   A   Y   A   A   Q
GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA GCT CAG

                290
G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A   T   L
GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA ACA CTG

                310
G   F   G   A   Y   M   S   K   A   H   G   I   D   P   N
GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT CCT AAC

                320
I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P   I   T
ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC ATC ACG

                340
Y   S   T   Y   G   K   F   L   A   D   G   G   C   S   G
TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC TCG GGG

                350
G   A   Y   D   I   I   C   D   E   C   H   S   T   D
GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG GAT

                370
A   T   S   I   L   G   I   G   T   V   L   D   Q   A   E
GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA GCA GAG

                380
T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T   P   P
ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC CCT CCG

                400
G   S   V   T   V   P   H   P   N   I   E   E   V   A   L
GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT GCT CTG

                410

```

FIG. 8B

ES 2 312 806 T3

S T T G E I P F Y G K A I P L
 TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC CCC CTC
 430
 E V I K G G R H L I F C H S K
 GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG
 440 450
 K K C D E L A A K L V A L G I
 AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG GGC ATC
 460
 N A V A Y Y R G L D V S V I P
 AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG
 470 480
 T S G D V V V V A T D A L M T
 ACC AGC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC ATG ACC
 490
 G Y T G D F D S V I D C N T C
 GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT
 500 510
 V T Q T V D F S L D P T F T I
 GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT
 520
 E T I T L P Q D A V S R T Q R
 GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT
 530 540
 R G R T G R G K P G I Y R F V
 CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA TTT GTG
 550
 A P G E R P S G M F D S S V L
 GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC
 560 570
 C E C Y D A G C A W Y E L T P
 TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC
 580
 A E T T V R L R A Y M N T P G
 GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG
 590 600
 L P V C Q D H L E F W E G V F
 CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC GTC TTT
 610
 T G L T H I D A H F L S Q T K
 ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG
 620 630
 Q S G E N L P Y L V A Y Q A T

FIG. 8C

ES 2 312 806 T3

CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC
 640
 V C A R A Q A P P S W D Q M
 GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC CAG ATG
 650 660
 W K C L I R L K P T L H G P T
 TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG CCA ACA
 670
 P L L Y R L G A V Q N E I T L
 CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG
 680 690
 T H P V T K Y I M T C M S A D
 ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG GCC GAC
 700
 L E V V T S A C S G K P A I I
 CTG GAG GTC GTC ACG AGC GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA
 710 720
 P D R E V L Y R E F D E M E E
 CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG
 730
 C S Q H L P Y I E Q G M M L A
 TGC TCT CAG CAC TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC
 740 750
 E Q F K Q K A L G L S R G G K
 GAG CAG TTC AAG CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG
 760
 P A I V P D K E V L Y Q Q Y D
 CCG GCA ATC GTT CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT
 770 780
 E M E E C S Q A A P Y I E Q A
 GAG ATG GAA GAG TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT
 790
 Q V I A H Q F K E K V L G L I
 CAG GTA ATA GCT CAC CAG TTC AAG GAA AAA GTC CTT GGA TTG ATC
 800 810
 D N D Q V V V T P D K E I L Y
 GAT AAT GAT CAA GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT
 820
 E A F D E M E E C A S K A A L
 GAG GCC TTT GAT GAG ATG GAA GAA TGC GCC TCC AAA GCC GCC CTC
 830 840
 I E E G Q R M A E M L K S K I
 ATT GAG GAA GGG CAG CGG ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA

FIG. 8D

ES 2 312 806 T3

850
 Q G L L G I L R R H V G P G E
 CAA GGC CTC CTC GGG ATA CTG CGC CGG CAC GTT GGT CCT GGC GAG
 860 870
 G A V Q W M N R L I A F A S R
 GGG GCA GTG CAG TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCC TTC GCC TCC AGA
 880
 G N H V S P T H Y V P S R S R
 GGG AAC CAT GTT TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CGG
 890 900
 R F A Q A L P V W A R P D Y N
 AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC
 910
 P P L V R T W K K P D Y E P P
 CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT
 920 930
 V V H G R S S R R F A Q A L P
 GTG GTC CAC GGC AGA TCT TCT CGG AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC
 940
 V W A R P D Y N P P L V E T W
 GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG
 950 960
 K K P D Y E P P V V H G R K T
 AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC
 970
 K R N T N R R P Q D V K F P G
 AAA CGT AAC ACC AAC CGG CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT
 980 990
 G G Q I V G R R G P P I P K A
 GGC GGT CAG ATC GTT GGT CGC AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT
 1000
 R R P E G R T W A Q P G Y P W
 CGT CGG CCC GAG GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG
 1010 1020
 P L Y G N K D R R S T G K S W
 CCC CTC TAT GGC AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG
 1030
 G K P G Y P W P R K T K R N T
 GGT AAG CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC
 1040 1050
 N R R P Q D V K F P G G G Q I
 AAC CGA CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC

FIG. 8E

														1060				
V	G	R	R	G	P	P	I	P	K	A	R	R	P	E				
GTT	GGT	CGC	AGG	GGC	CCT	CCT	ATC	CCC	AAG	GCT	CGT	CGG	CCC	GAG				
														1070				
G	R	T	W	A	Q	P	G	Y	P	W	P	L	Y	G			1080	
GGC	AGG	ACC	TGG	GCT	CAG	CCC	GGT	TAC	CCT	TGG	CCC	CTC	TAT	GGC				
														1090				
N	K	D	R	R	S	T	G	K	S	W	G	K	P	G				
AAT	AAG	GAC	AGA	CGG	TCT	ACC	GGT	AAG	TCC	TGG	GGT	AAG	CCA	GGG				
														1099				
Y	P	W	P															
TAT	CCT	TGG	CCC															

FIG. 8F

ANTÍGENO MEFA-3

hSOD- (1-154)	NÚCLEO	NÚCLEO	c33c	5-1-1 tipo 1	5-1-1 tipo 3	5-1-1 tipo 2	C-100	C-100	NS5	NS5
AMINO- ACIDOS	10 53	10 53	1192 1457	1694 1735	1694 1735	1694 1735	1901 1940	1901 1940	2278 2310	2278 2310

A

ANTÍGENO MEFA-5

hSOD- (1-154)	NÚCLEO	NÚCLEO	E1	E2	c33c	5-1-1 tipo 1	5-1-1 tipo 3	5-1-1 tipo 2	C-100	NS5	NS5
AMINO- ACIDOS	10 53	10 53	303 320	405 444	1192 1457	1689 1735	1689 1735	1689 1735	1901 1940	2278 2313	2278 2313

B

ANTÍGENO MEFA-6

hSOD- (1-154)	E1	E2	c33c	5-1-1 tipo 1	5-1-1 tipo 3	5-1-1 tipo 2	C-100	NS5	NS5	NÚCLEO	NÚCLEO
AMINO- ACIDOS	303 320	405 444	1192 1457	1689 1735	1689 1735	1689 1735	1901 1940	2278 2313	2278 2313	10 53	10 53

C

FIG. 9

ES 2 312 806 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CHIRON CORPORATION

5 <120> ENSAYO DE VHC

<130> 2300-19199,40

10 <150> 60/409,515

<151> 09-09-2002

<160> 9

15 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

20 <211> 2058

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Secuencia de ADN del epítipo conformacional de NS3/41

<400> 1

```

30      atg gcg ccc atc acg gcg tac gcc cag cag aca agg ggc ctc cta ggg      48
      Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
          1              5              10              15

35      tgc ata atc acc agc cta act ggc cgg gac aaa aac caa gtg gag ggt      96
      Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly
              20              25              30

40      gag gtc cag att gtg tca act gct gcc caa acc ttc ctg gca acg tgc      144
      Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
              35              40              45

45      atc aat ggg gtg tgc tgg act gtc tac cac ggg gcc gga acg agg acc      192
      Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
          50              55              60

50      atc gcg tca ccc aag ggt cct gtc atc cag atg tat acc aat gta gac      240
      Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
          65              70              75              80

55      caa gac ctt gtg ggc tgg ccc gct ccg caa ggt agc cga tca ttg aca      288
      Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr
              85              90              95

60      ccc tgc act tgc ggc tcc tcg gac ctt tac ctg gtc acg agg cac gcc      336
      Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
              100              105              110

65      gat gtc att ccc gtg cgc cgg cgg ggt gat agc agg ggc agc ctg ctg      384
      Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
              115              120              125

70      tcg ccc cgg ccc att tcc tac ttg aaa ggc tcc tcg ggg ggt ccg ctg      432
      Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
          130              135              140

```

ES 2 312 806 T3

	ttg tgc ccc gcg ggg cac gcc gtg ggc ata ttt agg gcc gcg gtg tgc	480
	Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys	
	145 150 155 160	
5	acc cgt gga gtg gct aag gcg gtg gac ttt atc cct gtg gag aac cta	528
	Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu	
	165 170 175	
10	gag aca acc atg agg tcc ccg gtg ttc acg gat aac tcc tct cca cca	576
	Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro	
	180 185 190	
15	gta gtg ccc cag agc ttc cag gtg gct cac ctg cat gct ccc aca ggc	624
	Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly	
	195 200 205	
20	agc ggc aaa agc acc aag gtc ccg gct gca tat gca gct cag ggc tat	672
	Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr	
	210 215 220	
25	aag gtg cta gta ctg aac ccc tct gtt gct gca aca ctg ggc ttt ggt	720
	Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly	
	225 230 235 240	
30	gct tac atg tcc aag gct cat ggg atc gat cct aac atc agg acc ggg	768
	Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly	
	245 250 255	
35	gtg aga aca att acc act ggc agc ccc atc acg tac tcc acc tac ggc	816
	Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly	
	260 265 270	
40	aag ttc ctt gcc gac ggc ggg tgc tgc ggg ggc gct tat gac ata ata	864
	Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile	
	275 280 285	
45	att tgt gac gag tgc cac tcc acg gat gcc aca tcc atc ttg ggc att	912
	Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile	
	290 295 300	
50	ggc act gtc ctt gac caa gca gag act gcg ggg gcg aga ctg gtt gtg	960
	Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val	
	305 310 315 320	
55	ctc gcc acc gcc acc cct ccg ggc tcc gtc act gtg ccc cat ccc aac	1008
	Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn	
	325 330 335	
60	atc gag gag gtt gct ctg tcc acc acc gga gag atc cct ttt tac ggc	1056
	Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly	
	340 345 350	
65	aag gct atc ccc ctg gaa gta atc aag ggg ggg aga cat ctg atc ttc	1104
	Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe	
	355 360 365	
70	tgt cat tca aag aag aag tgc gac gaa ctg gcc gca aag ctg gtc gca	1152
	Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala	
	370 375 380	

ES 2 312 806 T3

5	ttg ggc atc aat gcc gtg gcc tac tac cgc ggt ctt gac gtg tcc gtc Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val 385 390 395 400	1200
10	atc ccg ccc atc ggc gat gtt gtc gtc gtg gca acc gat gcc ctc atg Ile Pro Pro Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met 405 410 415	1248
15	acc ggc tat acc ggc gac ttc gac tgc gtg ata gac tgc aat acg tgt Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys 420 425 430	1296
20	gtc acc cag aca gtc gat ttc agc ctt gac cct acc ttc acc att gag Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu 435 440 445	1344
25	aca atc acg ctc ccc caa gat gct gtc tcc cgc act caa cgt cgg ggc Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly 450 455 460	1392
30	agg act ggc agg ggg aag cca ggc atc tac aga ttt gtg gca ccg ggg Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly 465 470 475 480	1440
35	gag cgc ccc tcc ggc atg ttc gac tgc tcc gtc ctc tgt gag tgc tat Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr 485 490 495	1488
40	gac gca ggc tgt gct tgg tat gag ctc acg ccc gcc gag act aca gtt Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val 500 505 510	1536
45	agg cta cga gcg tac atg aac acc ccg ggg ctt ccc gtg tgc cag gac Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp 515 520 525	1584
50	cat ctt gaa ttt tgg gag ggc gtc ttt aca ggc ctc act cat ata gat His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp 530 535 540	1632
55	gcc cac ttt cta tcc cag aca aag cag agt ggg gag aac ctt cct tac Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr 545 550 555 560	1680
60	ctg gta gcg tac caa gcc acc gtg tgc gct agg gct caa gcc cct ccc Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro 565 570 575	1728
65	cca tgc tgg gac cag atg tgg aag tgt ttg att cgc ctc aag ccc acc Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr 580 585 590	1776
70	ctc cat ggg cca aca ccc ctg cta tac aga ctg ggc gct gtt cag aat Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn 595 600 605	1824
75	gaa atc acc ctg acg cac cca gtc acc aaa tac atc atg aca tgc atg Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met 610 615 620	1872
80	tgc gcc gac ctg gag gtc gtc acg agc acc tgg gtg ctc gtt ggc ggc 625 630 635 640	1920

ES 2 312 806 T3

```

Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
625                630                635                640

5   gtc ctg gct gct ttg gcc gcg tat tgc ctg tca aca ggc tgc gtg gtc   1968
    Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
                645                650                655

10  ata gtg ggc agg gtc gtc ttg tcc ggg aag ccg gca atc ata cct gac   2016
    Ile Val Gly Arg Val Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
                660                665                670

15  agg gaa gtc ctc tac cga gag ttc gat gag atg gaa gag tgc           2058
    Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
                675                680                685

<210> 2
<211> 686
20  <212> PRT
    <213> Artificial

<220>
25  <223> Secuencia de aminoácidos del epítipo conformacional de NS3/41

<400> 2

30  Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
    1                5                10                15

    Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly
    20                25                30

35  Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
    35                40                45

40  Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
    50                55                60

    ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
    65                70                75                80

45  Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr
    85                90                95

50  Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
    100               105               110

    Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
    115               120               125

55  Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
    130               135               140

    Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
    145               150               155               160

    Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu
    165               170               175

65  Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro

```

ES 2 312 806 T3

	180	185	190
5	Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly 195 200 205		
	Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr 210 215 220		
10	Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly 225 230 235 240		
	Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly 245 250 255		
15	Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly 260 265 270		
20	Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile 275 280 285		
	Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile 290 295 300		
25	Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val 305 310 315 320		
30	Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn 325 330 335		
	Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly 340 345 350		
35	Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe 355 360 365		
40	Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala 370 375 380		
	Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val 385 390 395 400		
45	Ile Pro Pro Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met 405 410 415		
50	Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys 420 425 430		
	Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu 435 440 445		
55	Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly 450 455 460		
	Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly 465 470 475 480		
60	Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr 485 490 495		
65	Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val		

ES 2 312 806 T3

	500	505	510
5	Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp 515	520	525
	His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp 530	535	540
10	Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr 545	550	555
	Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro 565	570	575
15	Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr 580	585	590
20	Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn 595	600	605
	Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met 610	615	620
25	Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly 625	630	635
	Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val 645	650	655
30	Ile Val Gly Arg Val Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp 660	665	670
35	Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys 675	680	685
	<210> 3		
40	<211> 2499		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia de ADN de MEFA 12		
	<400> 3		
50	atg gct aca aag gct gtt tgt gtt ttg aag ggt gac ggc cca gtt caa 48 Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln 1 5 10 15		
55	ggt att att aac ttc gag cag aag gaa agt aat gga cca gtg aag gtg 96 Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val 20 25 30		
60	tgg gga agc att aaa gga ctg act gaa ggc ctg cat gga ttc cat gtt 144 Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val 35 40 45		
65	cat gag ttt gga gat aat aca gca ggc tgt acc agt gca ggt cct cac 192 His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His 50 55 60		

ES 2 312 806 T3

5	ttt aat cct cta tcc acg cgt ggt tgc aat tgc tct atc tat ccc ggc 240 Phe Asn Pro Leu Ser Thr Arg Gly Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly 65 70 75 80
10	cat ata acg ggt cac cgc atg gca tgg aag ctt ggt tcc gcc gcc aga 288 His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Lys Leu Gly Ser Ala Ala Arg 85 90 95
15	act acc tcg ggc ttt gtc tcc ttg ttc gcc cca ggt gcc aaa caa aac 336 Thr Thr Ser Gly Phe Val Ser Leu Phe Ala Pro Gly Ala Lys Gln Asn 100 105 110
20	gaa act cac gtc acg gga ggc gca gcc gcc cga act acg tct ggg ttg 384 Glu Thr His Val Thr Gly Gly Ala Ala Ala Arg Thr Thr Ser Gly Leu 115 120 125
25	acc tct ttg ttc tcc cca ggt gcc agc caa aac att caa ttg att act 432 Thr Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ala Ser Gln Asn Ile Gln Leu Ile Thr 130 135 140
30	agt acg gat aac tcc tct cca cca gta gtg ccc cag agc ttc cag gtg 480 Ser Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val 145 150 155 160
35	gct cac ctc cat gct ccc aca ggc agc ggc aaa agc acc aag gtc ccg 528 Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro 165 170 175
40	gct gca tat gca gct cag ggc tat aag gtg cta gta ctc aac ccc tct 576 Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser 180 185 190
45	gtt gct gca aca ctg ggc ttt ggt gct tac atg tcc aag gct cat ggg 624 Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly 195 200 205
50	atc gat cct aac atc agg acc ggg gtg aga aca att acc act ggc agc 672 Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser 210 215 220
55	ccc atc acg tac tcc acc tac ggc aag ttc ctt gcc gac ggc ggg tgc 720 Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys 225 230 235 240
60	tcg ggg ggc gct tat gac ata ata att tgt gac gag tgc cac tcc acg 768 Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr 245 250 255
65	gat gcc aca tcc atc ttg ggc atc ggc act gtc ctt gac caa gca gag 816 Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu 260 265 270
	act gcg ggg gcg aga ctg gtt gtg ctc gcc acc gcc acc cct ccg ggc 864 Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly 275 280 285
	tcc gtc act gtg ccc cat ccc aac atc gag gag gtt gct ctg tcc acc 912 Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr 290 295 300

ES 2 312 806 T3

5	acc gga gag atc cct ttt tac ggc aag gct atc ccc ctc gaa gta atc Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile 305 310 315 320	960
10	aag ggg ggg aga cat ctc atc ttc tgt cat tca aag aag aag tgc gac Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp 325 330 335	1008
15	gaa ctc gcc gca aag ctg gtc gca ttg ggc atc aat gcc gtg gcc tac Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr 340 345 350	1056
20	tac cgc ggt ctt gac gtg tcc gtc atc ccg acc agc ggc gat gtt gtc Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val 355 360 365	1104
25	gtc gtg gca acc gat gcc ctc atg acc ggc tat acc ggc gac ttc gac Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp 370 375 380	1152
30	tgc gtg ata gac tgc aat acg tgt gca tgc tcc ggg aag ccg gca atc Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Ala Cys Ser Gly Lys Pro Ala Ile 385 390 395 400	1200
35	ata cct gac agg gaa gtc ctc tac cga gag ttc gat gag atg gaa gag Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu 405 410 415	1248
40	tgc tct cag cac tta ccg tac atc gag caa ggg atg atg ctc gcc gag Cys Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu 420 425 430	1296
45	cag ttc aag cag aag gcc ctc ggc ctc tgc cga ggg ggc aag ccg gca Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Ser Arg Gly Gly Lys Pro Ala 435 440 445	1344
50	atc gtt cca gac aaa gag gtg ttg tat caa caa tac gat gag atg gaa Ile Val Pro Asp Lys Glu Val Leu Tyr Gln Gln Tyr Asp Glu Met Glu 450 455 460	1392
55	gag tgc tca caa gct gcc cca tat atc gaa caa gct cag gta ata gct Glu Cys Ser Gln Ala Ala Pro Tyr Ile Glu Gln Ala Gln Val Ile Ala 465 470 475 480	1440
60	cac cag ttc aag gaa aaa gtc ctt gga ttg atc gat aat gat caa gtg His Gln Phe Lys Glu Lys Val Leu Gly Leu Ile Asp Asn Asp Gln Val 485 490 495	1488
65	gtt gtg act cct gac aaa gaa atc tta tat gag gcc ttt gat gag atg Val Val Thr Pro Asp Lys Glu Ile Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu Met 500 505 510	1536
	gaa gaa tgc gcc toc aaa gcc gcc ctc att gag gaa ggg cag cgg atg Glu Glu Cys Ala Ser Lys Ala Ala Leu Ile Glu Glu Gly Gln Arg Met 515 520 525	1584
	gcg gag atg ctc aag tct aag ata caa ggc ctc ctc ggg ata ctg cgc Ala Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly Leu Leu Gly Ile Leu Arg 530 535 540	1632

ES 2 312 806 T3

5	cgg cac gtt ggt cct ggc gag ggg gca gtg cag tgg atg aac cgg ctg Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu 545 550 555 560	1680
10	ata gcc ttc gcc tcc aga ggg aac cat gtt tcc ccc acg cac tac gtt Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val 565 570 575	1728
15	ccg tct aga tcc cgg aga ttc gcc cag gcc ctg ccc gtt tgg gcg cgg Pro Ser Arg Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg 580 585 590	1776
20	ccg gac tat aac ccc ccg cta gtg gag acg tgg aaa aag ccc gac tac Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro Asp Tyr 595 600 605	1824
25	gaa cca cct gtg gtc cac ggc aga tct tct cgg aga ttc gcc cag gcc Glu Pro Pro Val Val His Gly Arg Ser Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala 610 615 620	1872
30	ctg ccc gtt tgg gcg cgg ccg gac tat aac ccc ccg cta gtg gag acg Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr 625 630 635 640	1920
35	tgg aaa aag ccc gac tac gaa cca cct gtg gtc cat ggc aga aag acc Trp Lys Lys Pro Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly Arg Lys Thr 645 650 655	1968
40	aaa cgt aac acc aac ccg cgg ccg cag gac gtc aag ttc ccg ggt ggc Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly 660 665 670	2016
45	ggg cag atc gtt ggt gga gtt tac ttg ttg ccg cgc agg ggc cct aga Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg 675 680 685	2064
50	ttg ggt gtg ctc gcg acg aga aag act tcc cct atc ccc aag gct cgt Leu Gly Val Leu Ala Thr Arg Lys Thr Ser Pro Ile Pro Lys Ala Arg 690 695 700	2112
55	cgg ccc gag ggc agg acc tgg gct cag ccc ggt tac cct tgg ccc ctc Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu 705 710 715 720	2160
60	tat ggc aat aag gac aga cgg tct aca ggt aag tcc tgg ggt aag cca Tyr Gly Asn Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro 725 730 735	2208
65	ggg tac cct tgg cca aga aag acc aaa cgt aac acc aac cgg cgg ccg Gly Tyr Pro Trp Pro Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro 740 745 750	2256
	cag gac gtc aag ttc ccg ggt ggc ggt cag atc gtt ggt gga gtt tac Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr 755 760 765	2304
	ttg ttg ccg cgc agg ggc cct aga ttg ggt gtg ctc gcg acg aga aag Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Leu Ala Thr Arg Lys 770 775 780	2352

ES 2 312 806 T3

act tcc cct atc ccc aag gct cgt cgg ccc gag ggc agg acc tgg gct 2400
 Thr Ser Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala
 785 790 795 800

5

cag ccc ggt tac cct tgg ccc ctc tat ggc aat aag gac aga cgg tct 2448
 Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Lys Asp Arg Arg Ser
 805 810 815

10

aca ggt aag tcc tgg ggt aag cca ggg tac cct tgg ccc taatgagtcg ac 2499
 Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly Tyr Pro Trp Pro
 820 825

15

<210> 4
 <211> 829
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de MEFA 12

25

<400> 4

Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln
 1 5 10 15

30

Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val
 20 25 30

Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val
 35 40 45

35

His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60

40

Phe Asn Pro Leu Ser Thr Arg Gly Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly
 65 70 75 80

His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Lys Leu Gly Ser Ala Ala Arg
 85 90 95

45

Thr Thr Ser Gly Phe Val Ser Leu Phe Ala Pro Gly Ala Lys Gln Asn
 100 105 110

50

Glu Thr His Val Thr Gly Gly Ala Ala Ala Arg Thr Thr Ser Gly Leu
 115 120 125

Thr Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ala Ser Gln Asn Ile Gln Leu Ile Thr
 130 135 140

55

Ser Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val
 145 150 155 160

60

Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro
 165 170 175

Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser
 180 185 190

65

Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly
 195 200 205

ES 2 312 806 T3

	Ile	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	Gly	Val	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Gly	Ser	
	210						215					220					
5	Pro	Ile	Thr	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Gly	Lys	Phe	Leu	Ala	Asp	Gly	Gly	Cys	
	225					230				235						240	
	Ser	Gly	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ile	Ile	Cys	Asp	Glu	Cys	His	Ser	Thr	
					245					250					255		
10	Asp	Ala	Thr	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	
				260					265					270			
15	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Val	Val	Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	
		275						280					285				
	Ser	Val	Thr	Val	Pro	His	Pro	Asn	Ile	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	
	290						295					300					
20	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ile	Pro	Leu	Glu	Val	Ile	
	305					310					315					320	
	Lys	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe	Cys	His	Ser	Lys	Lys	Lys	Cys	Asp	
25					325					330					335		
	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Ile	Asn	Ala	Val	Ala	Tyr	
				340				345					350				
30	Tyr	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Ser	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Gly	Asp	Val	Val	
		355						360					365				
	Val	Val	Ala	Thr	Asp	Ala	Leu	Met	Thr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	
35		370					375					380					
	Ser	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Ala	Cys	Ser	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	
	385					390					395					400	
40	Ile	Pro	Asp	Arg	Glu	Val	Leu	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp	Glu	Met	Glu	Glu	
				405						410					415		
	Cys	Ser	Gln	His	Leu	Pro	Tyr	Ile	Glu	Gln	Gly	Met	Met	Leu	Ala	Glu	
				420					425					430			
45	Gln	Phe	Lys	Gln	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	Arg	Gly	Gly	Lys	Pro	Ala	
		435						440					445				
50	Ile	Val	Pro	Asp	Lys	Glu	Val	Leu	Tyr	Gln	Gln	Tyr	Asp	Glu	Met	Glu	
	450						455					460					
	Glu	Cys	Ser	Gln	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ile	Glu	Gln	Ala	Gln	Val	Ile	Ala	
	465					470					475					480	
55	His	Gln	Phe	Lys	Glu	Lys	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Asp	Asn	Asp	Gln	Val	
				485						490					495		
	Val	Val	Thr	Pro	Asp	Lys	Glu	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ala	Phe	Asp	Glu	Met	
60				500					505					510			
	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	Lys	Ala	Ala	Leu	Ile	Glu	Glu	Gly	Gln	Arg	Met	
		515						520					525				

ES 2 312 806 T3

	Ala	Glu	Met	Leu	Lys	Ser	Lys	Ile	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Ile	Leu	Arg	
	530						535										540
5	Arg	His	Val	Gly	Pro	Gly	Glu	Gly	Ala	Val	Gln	Trp	Met	Asn	Arg	Leu	
	545						550										555
	Ile	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Gly	Asn	His	Val	Ser	Pro	Thr	His	Tyr	Val	
							565										570
10																	
	Pro	Ser	Arg	Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Gln	Ala	Leu	Pro	Val	Trp	Ala	Arg	
							580										585
	Pro	Asp	Tyr	Asn	Pro	Pro	Leu	Val	Glu	Thr	Trp	Lys	Lys	Pro	Asp	Tyr	
15							595										600
	Glu	Pro	Pro	Val	Val	His	Gly	Arg	Ser	Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Gln	Ala	
	610						615										620
20																	
	Leu	Pro	Val	Trp	Ala	Arg	Pro	Asp	Tyr	Asn	Pro	Pro	Leu	Val	Glu	Thr	
	625						630										635
	Trp	Lys	Lys	Pro	Asp	Tyr	Glu	Pro	Pro	Val	Val	His	Gly	Arg	Lys	Thr	
25							645										650
	Lys	Arg	Asn	Thr	Asn	Arg	Arg	Pro	Gln	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Gly	
							660										665
	Gly	Gln	Ile	Val	Gly	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	
30							675										680
	Leu	Gly	Val	Leu	Ala	Thr	Arg	Lys	Thr	Ser	Pro	Ile	Pro	Lys	Ala	Arg	
	690						695										700
35																	
	Arg	Pro	Glu	Gly	Arg	Thr	Trp	Ala	Gln	Pro	Gly	Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	
	705						710										715
	Tyr	Gly	Asn	Lys	Asp	Arg	Arg	Ser	Thr	Gly	Lys	Ser	Trp	Gly	Lys	Pro	
40							725										730
	Gly	Tyr	Pro	Trp	Pro	Arg	Lys	Thr	Lys	Arg	Asn	Thr	Asn	Arg	Arg	Pro	
							740										745
45																	
	Gln	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Val	Gly	Gly	Val	Tyr	
							755										760
	Leu	Leu	Pro	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Leu	Gly	Val	Leu	Ala	Thr	Arg	Lys	
50							770										775
	Thr	Ser	Pro	Ile	Pro	Lys	Ala	Arg	Arg	Pro	Glu	Gly	Arg	Thr	Trp	Ala	
	785						790										795
55																	
	Gln	Pro	Gly	Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	Tyr	Gly	Asn	Lys	Asp	Arg	Arg	Ser	
							805										810
	Thr	Gly	Lys	Ser	Trp	Gly	Lys	Pro	Gly	Tyr	Pro	Trp	Pro				
60							820										825

<210> 5

<211> 3297

65 <212> ADN

<213> Artificial

ES 2 312 806 T3

<220>

<223> Secuencia de ADN de MEFA 7.1

5 <400> 5

	atg gct aca aag gct gtt tgt gtt ttg aag ggt gac ggc cca gtt caa	48
	Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln	
	1 5 10 15	
10	ggg att att aac ttc gag cag aag gaa agt aat gga cca gtg aag gtg	96
	Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val	
	20 25 30	
15	tgg gga agc att aaa gga ctg act gaa ggc ctg cat gga ttc cat gtt	144
	Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val	
	35 40 45	
20	cat gag ttt gga gat aat aca gca ggc tgt acc agt gca ggt cct cac	192
	His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His	
	50 55 60	
25	ttt aat cct cta tcc aga aaa cac ggt ggg cca aag gat gaa gag agg	240
	Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg	
	65 70 75 80	
30	cat gtt gga gac ttg ggc aat gtg act gct gac aaa gat ggt gtg gcc	288
	His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala	
	85 90 95	
35	gat gtg tct att gaa gat tct gtg atc tca ctg tca gga gac cat tgc	336
	Asp Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys	
	100 105 110	
40	atc att ggc cgc aca ctg gtg gtc cat gaa aaa gca gat gac ttg ggc	384
	Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly	
	115 120 125	
45	aaa ggt gga aat gaa gaa agt aca aag aca gga aac gct gga agt cgt	432
	Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg	
	130 135 140	
50	ttg gct tgt ggt gta att ggg atc gcc cag aat ttg aat tct ggt tgc	480
	Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln Asn Leu Asn Ser Gly Cys	
	145 150 155 160	
55	aat tgc tct atc tat ccc ggc cat ata acg ggt cac cgc atg gca tgg	528
	Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp	
	165 170 175	
60	aag ctt ggt tcc gcc gcc aga act acc tcg ggc ttt gtc tcc ttg ttc	576
	Lys Leu Gly Ser Ala Ala Arg Thr Thr Ser Gly Phe Val Ser Leu Phe	
	180 185 190	
65	gcc cca ggt gcc aaa caa aac gaa act cac gtc acg gga ggc gca gcc	624
	Ala Pro Gly Ala Lys Gln Asn Glu Thr His Val Thr Gly Ala Ala	
	195 200 205	
	gcc cga act acg tct ggg ttg acc tct ttg ttc tcc cca ggt gcc agc	672

ES 2 312 806 T3

	Ala	Arg	Thr	Thr	Ser	Gly	Leu	Thr	Ser	Leu	Phe	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	
	210						215					220					
5	caa	aac	att	caa	ttg	att	gtc	gac	ttt	atc	cct	gtg	gag	aac	cta	gag	720
	Gln	Asn	Ile	Gln	Leu	Ile	Val	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Asn	Leu	Glu	
	225					230					235					240	
10	aca	acc	atg	cga	tct	ccg	gtg	ttc	acg	gat	aac	tcc	tct	cca	cca	gta	768
	Thr	Thr	Met	Arg	Ser	Pro	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro	Val	
					245					250						255	
15	gtg	ccc	cag	agc	ttc	cag	gtg	gct	cac	ctc	cat	gct	ccc	aca	ggc	agc	816
	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Gln	Val	Ala	His	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	
					260					265						270	
20	ggc	aaa	agc	acc	aag	gtc	ccg	gct	gca	tat	gca	gct	cag	ggc	tat	aag	864
	Gly	Lys	Ser	Thr	Lys	Val	Pro	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Gln	Gly	Tyr	Lys	
					275					280						285	
25	gtg	cta	gta	ctc	aac	ccc	tct	gtt	gct	gca	aca	ctg	ggc	ttt	ggt	gct	912
	Val	Leu	Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	
					290											300	
30	tac	atg	tcc	aag	gct	cat	ggg	atc	gat	cct	aac	atc	agg	acc	ggg	gtg	960
	Tyr	Met	Ser	Lys	Ala	His	Gly	Ile	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	Gly	Val	
	305						310					315				320	
35	aga	aca	att	acc	act	ggc	agc	ccc	atc	acg	tac	tcc	acc	tac	ggc	aag	1008
	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Gly	Ser	Pro	Ile	Thr	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Gly	Lys	
						325					330					335	
40	ttc	ctt	gcc	gac	ggc	ggg	tgc	tgc	ggg	ggc	gct	tat	gac	ata	ata	att	1056
	Phe	Leu	Ala	Asp	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ile	Ile	
					340						345					350	
45	tgt	gac	gag	tgc	cac	tcc	acg	gat	gcc	aca	tcc	atc	ttg	ggc	att	ggc	1104
	Cys	Asp	Glu	Cys	His	Ser	Thr	Asp	Ala	Thr	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	
									360							365	
50	act	gtc	ctt	gac	caa	gca	gag	act	gcg	ggg	gcg	aga	ctg	gtt	gtg	ctc	1152
	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Val	Val	Leu	
																380	
55	ggc	acc	gcc	acc	cct	ccg	ggc	tcc	gtc	act	gtg	ccc	cat	ccc	aac	atc	1200
	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Pro	His	Pro	Asn	Ile	
																400	
60	gag	gag	gtt	gct	ctg	tcc	acc	acc	gga	gag	atc	cct	ttt	tac	ggc	aag	1248
	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly	Lys	
																415	
65	gct	atc	ccc	ctc	gaa	gta	atc	aag	ggg	ggg	aga	cat	ctc	atc	ttc	tgt	1296
	Ala	Ile	Pro	Leu	Glu	Val	Ile	Lys	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe	Cys	
																430	
70	cat	tca	aag	aag	aag	tgc	gac	gaa	ctc	gcc	gca	aag	ctg	gtc	gca	ttg	1344
	His	Ser	Lys	Lys	Lys	Cys	Asp	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	Val	Ala	Leu	
																445	
75	ggc	atc	aat	gcc	gtg	gcc	tac	tac	cgc	ggt	ctt	gac	gtg	tcc	gtc	atc	1392

ES 2 312 806 T3

	Gly	Ile	Asn	Ala	Val	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Ser	Val	Ile	
	450						455					460					
5	ccg	acc	agc	ggc	gat	gtt	gtc	gtc	gtg	gca	acc	gat	gcc	ctc	atg	acc	1440
	Pro	Thr	Ser	Gly	Asp	Val	Val	Val	Val	Ala	Thr	Asp	Ala	Leu	Met	Thr	
	465					470					475					480	
10	ggc	tat	acc	ggc	gac	ttc	gac	tcg	gtg	ata	gac	tgc	aat	acg	tgt	gtc	1488
	Gly	Tyr	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	
					485					490					495		
15	acc	cag	aca	gtc	gat	ttc	agc	ctt	gac	cct	acc	ttc	acc	att	gag	aca	1536
	Thr	Gln	Thr	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu	Thr	
				500					505					510			
20	atc	acg	ctc	ccc	caa	gat	gct	gtc	tcc	cgc	act	caa	cgt	cgg	ggc	agg	1584
	Ile	Thr	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Gln	Arg	Arg	Gly	Arg	
			515					520					525				
25	act	ggc	agg	ggg	aag	cca	ggc	atc	tac	aga	ttt	gtg	gca	ccg	ggg	gag	1632
	Thr	Gly	Arg	Gly	Lys	Pro	Gly	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Ala	Pro	Gly	Glu	
		530					535					540					
30	cgc	ccc	tcc	ggc	atg	ttc	gac	tcg	tcc	gtc	ctc	tgt	gag	tgc	tat	gac	1680
	Arg	Pro	Ser	Gly	Met	Phe	Asp	Ser	Ser	Val	Leu	Cys	Glu	Cys	Tyr	Asp	
	545					550					555					560	
35	gca	ggc	tgt	gct	tgg	tat	gag	ctc	acg	ccc	gcc	gag	act	aca	gtt	agg	1728
	Ala	Gly	Cys	Ala	Trp	Tyr	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Glu	Thr	Thr	Val	Arg	
					565					570					575		
40	cta	cga	gcg	tac	atg	aac	acc	ccg	ggg	ctt	ccc	gtg	tgc	cag	gac	cat	1776
	Leu	Arg	Ala	Tyr	Met	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Cys	Gln	Asp	His	
				580					585					590			
45	ctt	gaa	ttt	tgg	gag	ggc	gtc	ttt	aca	ggc	ctc	act	cat	ata	gat	gcc	1824
	Leu	Glu	Phe	Trp	Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp	Ala	
			595				600						605				
50	cac	ttt	cta	tcc	cag	aca	aag	cag	agt	ggg	gag	aac	ctt	cct	tac	ctg	1872
	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	Pro	Tyr	Leu	
		610					615					620					
55	gta	gcg	tac	caa	gcc	acc	gtg	tgc	gct	agg	gct	caa	gcc	cct	ccc	cca	1920
	Val	Ala	Tyr	Gln	Ala	Thr	Val	Cys	Ala	Arg	Ala	Gln	Ala	Pro	Pro	Pro	
	625					630					635					640	
60	tcg	tgg	gac	cag	atg	tgg	aag	tgt	ttg	att	cgc	ctc	aag	ccc	acc	ctc	1968
	Ser	Trp	Asp	Gln	Met	Trp	Lys	Cys	Leu	Ile	Arg	Leu	Lys	Pro	Thr	Leu	
					645				650						655		
65	cat	ggg	cca	aca	ccc	ctg	cta	tac	aga	ctg	ggc	gct	gtt	cag	aat	gaa	2016
	His	Gly	Pro	Thr	Pro	Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Asn	Glu	
				660					665					670			
70	atc	acc	ctg	acg	cac	cca	gtc	acc	aaa	tac	atc	atg	aca	tgc	atg	tcg	2064
	Ile	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Val	Thr	Lys	Tyr	Ile	Met	Thr	Cys	Met	Ser	
			675					680					685				
75	gcc	gac	ctg	gag	gtc	gtc	acg	agc	gca	tgc	tcc	ggg	aag	ccg	gca	atc	2112

ES 2 312 806 T3

	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Thr	Ser	Ala	Cys	Ser	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	
	690						695					700					
5	ata	cct	gac	agg	gaa	gtc	ctc	tac	cga	gag	ttc	gat	gag	atg	gaa	gag	2160
	Ile	Pro	Asp	Arg	Glu	Val	Leu	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp	Glu	Met	Glu	Glu	
	705					710					715					720	
10	tgc	tct	cag	cac	tta	ccg	tac	atc	gag	caa	ggg	atg	atg	ctc	gcc	gag	2208
	Cys	Ser	Gln	His	Leu	Pro	Tyr	Ile	Glu	Gln	Gly	Met	Met	Leu	Ala	Glu	
					725					730					735		
15	cag	ttc	aag	cag	aag	gcc	ctc	ggc	ctc	tgc	cga	ggg	ggc	aag	ccg	gca	2256
	Gln	Phe	Lys	Gln	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	Arg	Gly	Gly	Lys	Pro	Ala	
				740				745						750			
20	atc	gtt	cca	gac	aaa	gag	gtg	ttg	tat	caa	caa	tac	gat	gag	atg	gaa	2304
	Ile	Val	Pro	Asp	Lys	Glu	Val	Leu	Tyr	Gln	Gln	Tyr	Asp	Glu	Met	Glu	
			755					760					765				
25	gag	tgc	tca	caa	gct	gcc	cca	tat	atc	gaa	caa	gct	cag	gta	ata	gct	2352
	Glu	Cys	Ser	Gln	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ile	Glu	Gln	Ala	Gln	Val	Ile	Ala	
		770					775					780					
30	cac	cag	ttc	aag	gaa	aaa	gtc	ctt	gga	ttg	atc	gat	aat	gat	caa	gtg	2400
	His	Gln	Phe	Lys	Glu	Lys	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Asp	Asn	Asp	Gln	Val	
	785					790					795					800	
35	gtt	gtg	act	cct	gac	aaa	gaa	atc	tta	tat	gag	gcc	ttt	gat	gag	atg	2448
	Val	Val	Thr	Pro	Asp	Lys	Glu	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ala	Phe	Asp	Glu	Met	
				805					810						815		
40	gaa	gaa	tgc	gcc	tcc	aaa	gcc	gcc	ctc	att	gag	gaa	ggg	cag	cgg	atg	2496
	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	Lys	Ala	Ala	Leu	Ile	Glu	Glu	Gly	Gln	Arg	Met	
				820					825					830			
45	gcg	gag	atg	ctc	aag	tct	aag	ata	caa	ggc	ctc	ctc	ggg	ata	ctg	cgc	2544
	Ala	Glu	Met	Leu	Lys	Ser	Lys	Ile	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Ile	Leu	Arg	
			835					840					845				
50	cgg	cac	gtt	ggc	cct	ggc	gag	ggg	gca	gtg	cag	tgg	atg	aac	cgg	ctg	2592
	Arg	His	Val	Gly	Pro	Gly	Glu	Gly	Ala	Val	Gln	Trp	Met	Asn	Arg	Leu	
		850				855						860					
55	ata	gcc	ttc	gcc	tcc	aga	ggg	aac	cat	gtt	tcc	ccc	acg	cac	tac	gtt	2640
	Ile	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Gly	Asn	His	Val	Ser	Pro	Thr	His	Tyr	Val	
	865					870					875					880	
60	ccg	tct	aga	tcc	cgg	aga	ttc	gcc	cag	gcc	ctg	ccc	gtt	tgg	gcg	cgg	2688
	Pro	Ser	Arg	Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Gln	Ala	Leu	Pro	Val	Trp	Ala	Arg	
				885					890						895		
65	ccg	gac	tat	aac	ccc	ccg	cta	gtg	gag	acg	tgg	aaa	aag	ccc	gac	tac	2736
	Pro	Asp	Tyr	Asn	Pro	Pro	Leu	Val	Glu	Thr	Trp	Lys	Lys	Pro	Asp	Tyr	
				900					905					910			
70	gaa	cca	cct	gtg	gtc	cac	ggc	aga	tct	tct	cgg	aga	ttc	gcc	cag	gcc	2784
	Glu	Pro	Pro	Val	Val	His	Gly	Arg	Ser	Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Gln	Ala	
			915					920					925				
75	ctg	ccc	gtt	tgg	gcg	cgg	ccg	gac	tat	aac	ccc	ccg	cta	gtg	gag	acg	2832

ES 2 312 806 T3

	Leu	Pro	Val	Trp	Ala	Arg	Pro	Asp	Tyr	Asn	Pro	Pro	Leu	Val	Glu	Thr	
	930						935					940					
5	tgg	aaa	aag	ccc	gac	tac	gaa	cca	cct	gtg	gtc	cat	ggc	aga	aag	acc	2880
	Trp	Lys	Lys	Pro	Asp	Tyr	Glu	Pro	Pro	Val	Val	His	Gly	Arg	Lys	Thr	
	945					950					955					960	
10	aaa	cgt	aac	acc	aac	cgg	cgg	ccg	cag	gac	gtc	aag	ttc	ccg	ggg	ggc	2928
	Lys	Arg	Asn	Thr	Asn	Arg	Arg	Pro	Gln	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Gly	
					965					970					975		
15	ggg	cag	atc	gtt	ggg	cgc	agg	ggc	cct	cct	atc	ccc	aag	gct	cgt	cgg	2976
	Gly	Gln	Ile	Val	Gly	Arg	Arg	Gly	Pro	Pro	Ile	Pro	Lys	Ala	Arg	Arg	
				980					985					990			
20	ccc	gag	ggc	agg	acc	tgg	gct	cag	ccc	ggg	tac	cct	tgg	ccc	ctc	tat	3024
	Pro	Glu	Gly	Arg	Thr	Trp	Ala	Gln	Pro	Gly	Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	Tyr	
			995				1000						1005				
25	ggc	aat	aag	gac	aga	cgg	tct	aca	ggg	aag	tcc	tgg	ggg	aag	cca	ggg	3072
	Gly	Asn	Lys	Asp	Arg	Arg	Ser	Thr	Gly	Lys	Ser	Trp	Gly	Lys	Pro	Gly	
	1010					1015					1020						
30	tac	cct	tgg	cca	aga	aag	acc	aaa	cgt	aac	acc	aac	cga	cgg	ccg	cag	3120
	Tyr	Pro	Trp	Pro	Arg	Lys	Thr	Lys	Arg	Asn	Thr	Asn	Arg	Arg	Pro	Gln	
	1025				1030					1035					1040		
35	gac	gtc	aag	ttc	ccg	ggg	ggc	ggg	cag	atc	gtt	ggg	cgc	agg	ggc	cct	3168
	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Val	Gly	Arg	Arg	Gly	Pro	
				1045					1050						1055		
40	cct	atc	ccc	aag	gct	cgt	cgg	ccc	gag	ggc	agg	acc	tgg	gct	cag	ccc	3216
	Pro	Ile	Pro	Lys	Ala	Arg	Arg	Pro	Glu	Gly	Arg	Thr	Trp	Ala	Gln	Pro	
				1060				1065					1070				
45	ggg	tac	cct	tgg	ccc	ctc	tat	ggc	aat	aag	gac	aga	cgg	tct	acc	ggg	3264
	Gly	Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	Tyr	Gly	Asn	Lys	Asp	Arg	Arg	Ser	Thr	Gly	
		1075				1080						1085					
50	aag	tcc	tgg	ggg	aag	cca	ggg	tat	cct	tgg	ccc						3297
	Lys	Ser	Trp	Gly	Lys	Pro	Gly	Tyr	Pro	Trp	Pro						
	1090					1095											

<210> 6

<211> 1099

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de MEFA 7.1

ES 2 312 806 T3

<400> 6

	Met	Ala	Thr	Lys	Ala	Val	Cys	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Gln	
	1				5					10					15		
5	Gly	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu	Gln	Lys	Glu	Ser	Asn	Gly	Pro	Val	Lys	Val	
				20					25					30			
	Trp	Gly	Ser	Ile	Lys	Gly	Leu	Thr	Glu	Gly	Leu	His	Gly	Phe	His	Val	
10																	
15																	
	His	Glu	Phe	Gly	Asp	Asn	Thr	Ala	Gly	Cys	Thr	Ser	Ala	Gly	Pro	His	
	50						55					60					
	Phe	Asn	Pro	Leu	Ser	Arg	Lys	His	Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	Glu	Glu	Arg	
20	65					70					75					80	
	His	Val	Gly	Asp	Leu	Gly	Asn	Val	Thr	Ala	Asp	Lys	Asp	Gly	Val	Ala	
					85					90					95		
25	Asp	Val	Ser	Ile	Glu	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Gly	Asp	His	Cys	
				100					105					110			
	Ile	Ile	Gly	Arg	Thr	Leu	Val	Val	His	Glu	Lys	Ala	Asp	Asp	Leu	Gly	
30			115					120						125			
	Lys	Gly	Gly	Asn	Glu	Glu	Ser	Thr	Lys	Thr	Gly	Asn	Ala	Gly	Ser	Arg	
		130					135					140					
35	Leu	Ala	Cys	Gly	Val	Ile	Gly	Ile	Ala	Gln	Asn	Leu	Asn	Ser	Gly	Cys	
	145					150					155					160	
	Asn	Cys	Ser	Ile	Tyr	Pro	Gly	His	Ile	Thr	Gly	His	Arg	Met	Ala	Trp	
40				165						170					175		
	Lys	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala	Arg	Thr	Thr	Ser	Gly	Phe	Val	Ser	Leu	Phe	
				180						185				190			
45	Ala	Pro	Gly	Ala	Lys	Gln	Asn	Glu	Thr	His	Val	Thr	Gly	Gly	Ala	Ala	
		195						200					205				
	Ala	Arg	Thr	Thr	Ser	Gly	Leu	Thr	Ser	Leu	Phe	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	
50		210					215					220					
	Gln	Asn	Ile	Gln	Leu	Ile	Val	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Asn	Leu	Glu	
	225					230					235					240	
55	Thr	Thr	Met	Arg	Ser	Pro	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro	Val	
					245					250					255		
	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Gln	Val	Ala	His	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	
60				260					265					270			
	Gly	Lys	Ser	Thr	Lys	Val	Pro	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Gln	Gly	Tyr	Lys	
			275					280					285				
65	Val	Leu	Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	
		290					295					300					

ES 2 312 806 T3

	Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val	305	310	315	320
5	Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys		325	330	335
10	Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile		340	345	350
	Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly		355	360	365
15	Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu		370	375	380
20	Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile		385	390	395
	Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys		405	410	415
25	Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys		420	425	430
30	His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu		435	440	445
	Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile		450	455	460
35	Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr		465	470	475
40	Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val		485	490	495
	Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr		500	505	510
45	Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg		515	520	525
50	Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu		530	535	540
	Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp		545	550	555
55	Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg		565	570	575
60	Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His		580	585	590
	Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala		595	600	605

ES 2 312 806 T3

	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	Pro	Tyr	Leu	
	610						615					620					
5	Val	Ala	Tyr	Gln	Ala	Thr	Val	Cys	Ala	Arg	Ala	Gln	Ala	Pro	Pro	Pro	
	625					630					635					640	
	Ser	Trp	Asp	Gln	Met	Trp	Lys	Cys	Leu	Ile	Arg	Leu	Lys	Pro	Thr	Leu	
10					645					650					655		
	His	Gly	Pro	Thr	Pro	Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Asn	Glu	
				660					665					670			
15	Ile	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Val	Thr	Lys	Tyr	Ile	Met	Thr	Cys	Met	Ser	
			675					680					685				
	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Thr	Ser	Ala	Cys	Ser	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	
20		690					695					700					
	Ile	Pro	Asp	Arg	Glu	Val	Leu	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp	Glu	Met	Glu	Glu	
	705					710					715					720	
25	Cys	Ser	Gln	His	Leu	Pro	Tyr	Ile	Glu	Gln	Gly	Met	Met	Leu	Ala	Glu	
					725					730					735		
	Gln	Phe	Lys	Gln	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	Arg	Gly	Gly	Lys	Pro	Ala	
30				740				745						750			
	Ile	Val	Pro	Asp	Lys	Glu	Val	Leu	Tyr	Gln	Gln	Tyr	Asp	Glu	Met	Glu	
			755					760					765				
35	Glu	Cys	Ser	Gln	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ile	Glu	Gln	Ala	Gln	Val	Ile	Ala	
		770					775					780					
	His	Gln	Phe	Lys	Glu	Lys	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Asp	Asn	Asp	Gln	Val	
40		785				790					795					800	
	Val	Val	Thr	Pro	Asp	Lys	Glu	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ala	Phe	Asp	Glu	Met	
					805					810					815		
45	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	Lys	Ala	Ala	Leu	Ile	Glu	Glu	Gly	Gln	Arg	Met	
				820					825					830			
	Ala	Glu	Met	Leu	Lys	Ser	Lys	Ile	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Ile	Leu	Arg	
50			835					840					845				
	Arg	His	Val	Gly	Pro	Gly	Glu	Gly	Ala	Val	Gln	Trp	Met	Asn	Arg	Leu	
		850					855					860					
55	Ile	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Gly	Asn	His	Val	Ser	Pro	Thr	His	Tyr	Val	
		865				870					875					880	
	Pro	Ser	Arg	Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Gln	Ala	Leu	Pro	Val	Trp	Ala	Arg	
60					885					890					895		
	Pro	Asp	Tyr	Asn	Pro	Pro	Leu	Val	Glu	Thr	Trp	Lys	Lys	Pro	Asp	Tyr	
				900					905					910			

ES 2 312 806 T3

Glu Pro Pro Val Val His Gly Arg Ser Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala
 915 920 925
 5 Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr
 930 935 940
 10 Trp Lys Lys Pro Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly Arg Lys Thr
 945 950 955 960
 Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly
 965 970 975
 15 Gly Gln Ile Val Gly Arg Arg Gly Pro Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg
 980 985 990
 Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr
 995 1000 1005
 20 Gly Asn Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly
 1010 1015 1020
 25 Tyr Pro Trp Pro Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln
 1025 1030 1035 1040
 Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Arg Arg Gly Pro
 1045 1050 1055
 30 Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro
 1060 1065 1070
 35 Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly
 1075 1080 1085
 40 Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly Tyr Pro Trp Pro
 1090 1095

<210> 7

<211> 21

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> Secuencia consenso

<400> 7

55 Gly Ser Ala Ala Arg Thr Thr Ser Gly Phe Val Ser Leu Phe Ala Pro
 1 5 10 15

60 Gly Ala Lys Gln Asn
 20

<210> 8

65 <211> 10

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 312 806 T3

<220>

<223> Secuencia tras el sitio HindIII

5 <400> 8

acaaaacaaa

10

10 <210> 9

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido NS4A

20 <400> 9

Lys Lys Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys
1 5 10 15

25

Pro Ala Ile Ile Pro Lys Lys
20

30

35

40

45

50

55

60

65