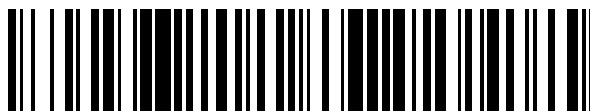


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 832 335**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2015 PCT/US2015/036941**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16160046**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2015 E 15888046 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2020 EP 3274478**

54 Título: **Polipéptidos NS4A/NS3 modificado del VHC y usos de los mismos**

30 Prioridad:

27.03.2015 US 201562139183 P

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

10.06.2021

73 Titular/es:

**ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS INC (33.3%)
1001 U.S. Route 202
Raritan, New Jersey 08869, US;
ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS, K.K. (33.3%) y
GRIFOLS WORLDWIDE OPERATIONS LIMITED
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**CHIEN, DAVID, Y.;
COIT, DORIS, GUENZI;
FUJIHARA, TOSHIYA;
GYENES, ALEXANDER;
HALL, JOHN, ANDREW;
MEDINA-SELBY, ANGELICA y
ZHENG, JIAN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 832 335 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

Polipéptidos NS4A/NS3 modificado del VHC y usos de los mismos

5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de patente de los Estados Unidos No. 62/139.183, presentada el 27 de marzo de 2015.

10 Declaración sobre la investigación o el desarrollo patrocinados por el gobierno federal

No aplicable.

Campo de la invención

15 La invención se refiere en general a constructos del virus de la hepatitis C (VHC) y métodos para usar los mismos. Más particularmente, la invención se refiere a polipéptidos del VHC inmunogénicos e inmunorreactivos con dominios de NS4a y NS3 modificado. Los polipéptidos modificados retienen epítopos conformacionales y, por lo tanto, son útiles en inmunoensayos para diagnosticar la infección por VHC.

20 Antecedentes de la invención

25 El virus de la hepatitis C (VHC) es la causa principal de la hepatitis parenteral no A, no B (NANBH) que se transmite en gran medida a través de la transfusión de sangre corporal y el intercambio de fluidos corporales. El virus está presente en 0,4 a 2,0% de la población general en los Estados Unidos. La hepatitis crónica se desarrolla en aproximadamente el 50% de las infecciones y, de estas, aproximadamente el 20% de los individuos infectados desarrollan cirrosis hepática que a veces conduce a un carcinoma hepatocelular. En consecuencia, el estudio y el control de la enfermedad es de importancia médica.

30 El VHC fue identificado y caracterizado por primera vez como una causa de NANBH por Houghton y col., Se conoce la secuencia genómica viral del VHC, así como los métodos 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 miembro de la familia de virus Flaviridae. Se han identificado al menos seis genotipos distintos pero relacionados del VHC, con base en análisis filogenéticos (Simmonds y col., J. Gen. Virol. (1993) 74: 2391-2399). El virus codifica una sola poliproteína que tiene más de 3000 residuos de aminoácidos (Choo y col., Science (1989) 244: 359-362; Choo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 2451-2455; Han y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 1711-1715). La poliproteína se procesa cotraduccionalmente y postraduccionalmente en proteínas estructurales y no estructurales (NS).

40 En particular, varias proteínas están codificadas por el genoma del VHC. El orden y la nomenclatura de los productos de escisión de la poliproteína del VHC es el siguiente: NH₂-C-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. La escisión inicial de la poliproteína es catalizada por proteasas del huésped que liberan tres proteínas estructurales, la proteína de la nucleocápside del terminal N (denominada "núcleo") y dos glicoproteínas de la envoltura, "E1" (también conocida como E) y "E2" (también conocida como E2/NS1), así como proteínas no estructurales (NS) que contienen las enzimas virales. Las regiones NS se denominan NS2, NS3, NS4, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b. NS2 es una proteína de membrana integral con actividad proteolítica. NS2, ya sea solo o en combinación con NS3, escinde el enlace escindible NS2-NS3 que a su vez genera el terminal N de NS3 y libera una poliproteína grande que incluye actividades de serina proteasa y ARN helicasa. La proteasa NS3 sirve para procesar la poliproteína restante. En particular, la proteína NS3 del VHC es una proteína de 630 aminoácidos que contiene tres dominios funcionales. El dominio de proteasa de tipo serina se encuentra en el terminal amino, mientras que la actividad helicasa y NTPasa se encuentra en el terminal carboxilo. La serina proteasa de NS3 es responsable de la escisión en la unión de NS3/4a, NS4a/b, NS4b/5a y NS5a/b.

55 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 y col., publicaciones europeas Nos. 318.216 y 388.232; Choo y col., Science (1989) 244: 359-362; Kuo y col., Science (1989) 244: 362-364; Houghton y col., Hepatology (1991) 14: 381-388; Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10011-10015; Chien y col., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33-39; Chien y col., publicación internacional No. WO 93/00365; Chien, D. Y., publicación internacional No. WO 94/01778. Estas publicaciones proporcionan una amplia información sobre el VHC en general, así como sobre la fabricación y los usos de reactivos inmunológicos de polipéptidos del VHC.

60 Los métodos sensibles y específicos para cribar e identificar portadores del VHC y sangre o productos sanguíneos contaminados con VHC proporcionan un avance importante en la medicina. La hepatitis postransfusional (PTH) se presenta en aproximadamente el 10% de los pacientes transfundidos y el VHC ha representado hasta el 90% de estos casos. La atención al paciente, así como la prevención y transmisión del VHC por sangre y productos sanguíneos o por contacto personal cercano, requieren herramientas de diagnóstico y pronóstico fiables. Por consiguiente, se han

desarrollado varios ensayos para el serodiagnóstico de la infección por VHC. Véase, por ejemplo, Choo y col., Science (1989) 244: 359-362; Kuo y col., Science (1989) 244: 362-364; Choo y col., Br. Med. Bull. (1990) 46: 423-441; Ebeling y col., Lancet (1990) 335: 982-983; van der Poel y col., Lancet (1990) 335: 558-560; van der Poel y col., Lancet (1991) 337: 317-319; Chien, D. Y., publicación internacional No. WO 94/01778; Valenzuela y col., publicación internacional No. WO 97/44469; y Kashiwakuma y col., patente de los Estados Unidos No. 5.871.904.

La patente de los Estados Unidos No. 6.630.298, describe un ensayo de combinación de antígeno/anticuerpo del VHC que usa un anticuerpo del núcleo del VHC para detectar el antígeno del VHC y el epítipo NS3/4a para detectar el anticuerpo del VHC. El epítipo NS3/4a tiene NS3 en el terminal amino y NS4a en el terminal carboxilo. La actividad proteasa del dominio de NS3 se conserva en este epítipo y la estabilidad se ve afectada negativamente por la presencia de la actividad proteasa.

La patente de los Estados Unidos No. 6.632.601, describe inmunoensayos que utilizan epítopos conformacionales NS3/4a, en combinación con antígenos de fusión de múltiples epítopos (MEFA). Los ensayos proporcionan métodos para detectar la seroconversión temprana del VHC. NS3/4a, expresada en levadura y purificada en condiciones no desnaturizantes como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6.632.601, contiene función tanto proteasa como helicasa. Debido a que NS3/4a purificada de esta manera conserva la conformación nativa, se ha encontrado que es más sensible que los antígenos c200 o c33c en la detección temprana de anticuerpos por seroconversión. En los ensayos de anticuerpos que utilizan NS3/4a y MEFA 7.1 como antígenos, los anticuerpos de seroconversión se detectaron de 2 a 14 días antes que los ensayos del VHC comercializados en ese momento. Sin embargo, la proteína NS3/4a sufre autohidrólisis y escinde MEFA 7.1 debido a la actividad proteasa de NS3.

La patente de los Estados Unidos No. 7.491.808 describe epítopos conformacionales NS3/4a que incluyen dominios proteasa de NS3 mutados con actividad proteolítica reducida, en combinación con MEFA.

La patente de los Estados Unidos No. 6.211.338 describe complejos covalentes NS4a/NS3 del VHC que comprenden el dominio hidrófobo central del péptido NS4a del VHC nativo, un enlazador y el dominio serina proteasa de NS3 del VHC. El complejo NS4a/NS3 es útil para la determinación estructural y la determinación del modo de unión de los inhibidores del VHC mediante espectroscopia de RMN.

Sigue existiendo la necesidad de herramientas de diagnóstico y pronóstico sensibles y precisas para proporcionar una atención adecuada al paciente, así como para prevenir la transmisión del VHC por sangre y productos sanguíneos o por contacto personal cercano.

Breve resumen de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el hallazgo de que el uso de un polipéptido NS4a/NS3 modificado del VHC proporciona reactivos superiores para detectar la infección por VHC. Los polipéptidos NS4a/NS3 modificado retienen epítopos conformacionales y por lo tanto inmunoreactividad y, por lo tanto, pueden usarse solos o en combinación con otros reactivos del VHC para detectar de manera precisa y eficiente la presencia de infección por VHC, particularmente la detección temprana de anticuerpos específicos del VHC. Los ensayos descritos en el presente documento pueden usarse para detectar la infección por VHC causada por cualquiera de los seis genotipos conocidos del VHC.

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación se dirige a un reactivo de inmunoensayo que comprende un polipéptido que comprende un dominio de NS4a del virus de la hepatitis C (VHC) que tiene la SEQ ID NO: 3, un dominio de NS3 del VHC modificado que tiene la SEQ ID NO: 4, en la que uno o más residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 se modifican de manera que la actividad proteasa del dominio de NS3 modificado del virus de la hepatitis C se inhibe en relación con la actividad proteasa del dominio de NS3 del virus de la hepatitis C que tiene SEQ ID NO: 4 que carece de las modificaciones, y una región intermedia que conecta el terminal carboxilo del dominio de NS4a con el terminal amino del dominio de NS3 modificado, o un polipéptido que tiene al menos un 90% de homología de aminoácidos con dicho polipéptido, o un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad de aminoácidos con dicho polipéptido. El dominio de NS3 se modifica con respecto al dominio de NS3 nativo del VHC en el sentido de que los residuos de aminoácidos 15 y 16 en la SEQ ID NO: 4 son lisina (K) en lugar de isoleucina (I). Preferiblemente, la modificación para inhibir la actividad proteasa comprende la sustitución de uno o más de los residuos de aminoácidos 55, 79 y 137 de la SEQ ID NO: 4, preferiblemente una sustitución de alanina o glicina. En una realización preferida, la modificación para inhibir la actividad proteasa comprende la sustitución de alanina por el residuo de aminoácido 137 de la SEQ ID NO: 4.

En una realización preferida del polipéptido de la presente invención, la región intermedia es el triplete de aminoácidos SGS, dando como resultado un polipéptido que comprende, o más particularmente que consiste en, la SEQ ID NO: 2. La región intermedia, preferiblemente un enlazador flexible tripéptido, se denomina secuencia de "giro". La secuencia de giro permite que el dominio de NS4a se pliegue en el bolsillo dentro de la región de proteasa del dominio de NS3.

En realizaciones adicionales, el reactivo de inmunoensayo de la presente invención está unido a un soporte sólido.

En otras realizaciones, la invención se dirige a un método para detectar anticuerpos contra el VHC en una muestra biológica. El método comprende: (a) proporcionar un reactivo de inmunoensayo según se reivindica; (b) combinar una muestra biológica con el reactivo de inmunoensayo en condiciones que permitan que los anticuerpos del VHC, cuando estén presentes en la muestra biológica, se unan al polipéptido para formar un primer complejo inmune; (c) añadir al primer complejo inmune de la etapa (b) un detector marcado, en el que el detector marcado es reactivo con el complejo inmune; y (d) detectar segundos complejos inmunes formados entre el detector marcado y el primer complejo inmune, si lo hay, como una indicación de la presencia de anticuerpos del VHC en la muestra biológica. Preferiblemente, el detector marcado es un anticuerpo o un antígeno. Preferiblemente, el reactivo de inmunoensayo se une a un soporte sólido.

En una realización adicional, la invención se dirige a un método para detectar anticuerpos contra el virus de la hepatitis C y/o el antígeno del virus de la hepatitis C (un ensayo de "combinación" o "combo") en una muestra biológica. El método comprende: (a) proporcionar un reactivo de inmunoensayo según se reivindica; (b) combinar una muestra biológica con el reactivo de inmunoensayo y uno o más anticuerpos anti-VHC en condiciones que permitan que los anticuerpos del VHC, cuando estén presentes en la muestra biológica, se unan al polipéptido para formar un primer complejo inmune, y que además permitan que los antígenos del VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, se unan a los anticuerpos anti-VHC para formar un segundo complejo inmune; (c) añadir al primer complejo inmune de la etapa (b) un primer detector marcado, en el que el primer detector marcado es reactivo con dicho primer complejo inmune, y añadir al segundo complejo inmunitario del paso (b) un segundo detector marcado, en el que el segundo detector marcado es reactivo con el segundo complejo inmune; (d) detectar los terceros complejos inmunes formados entre el primer detector marcado y el primer complejo inmune, si los hay, y detectar los cuartos complejos inmunes formados entre el segundo detector marcado y el segundo complejo inmune, si los hay, como indicación de la presencia de anticuerpos contra el VHC y/o la presencia de antígenos del VHC en la muestra biológica. Preferiblemente, el primer detector marcado y el segundo detector marcado son cada uno el anticuerpo marcado o el antígeno marcado (en cualquier combinación de los mismos; es decir, ambos podrían ser anticuerpos marcados; ambos podrían ser antígenos marcados; uno podría ser anticuerpo marcado mientras que el otro es antígeno marcado). Preferiblemente, uno o más reactivos del inmunoensayo y uno o más anticuerpos anti-VHC se unen al mismo soporte sólido o diferente.

En otras realizaciones más, la invención se dirige a un kit de prueba de inmunodiagnóstico que comprende un reactivo de inmunoensayo según se reivindica; e instrucciones para realizar la prueba de inmunodiagnóstico.

En una realización adicional, la invención está dirigida a un kit de prueba de inmunodiagnóstico que comprende además uno o más anticuerpos anti-VHC, preferiblemente anticuerpo nuclear anti-VHC.

En realizaciones adicionales, la invención se dirige a un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En realizaciones adicionales, la invención proporciona un método para seleccionar muestras biológicas de un suministro de muestras biológicas humanas que comprende seleccionar del suministro aquellas muestras que comprenden anticuerpos que forman un complejo antígeno-anticuerpo con el reactivo de inmunoensayo de acuerdo con la presente invención. Esto es útil para identificar una muestra positiva para el VHC para su extracción del suministro, particularmente relevante cuando el suministro es un suministro de sangre. Las muestras que no se seleccionan se pueden emplear para la preparación de productos relacionados con la sangre. Al identificar una muestra positiva para el VHC, el método también puede ser útil en el enriquecimiento de muestras positivas.

La invención proporciona además un método para seleccionar muestras biológicas de un suministro de muestras biológicas humanas que comprende seleccionar del suministro aquellas muestras que no comprenden anticuerpos que forman un complejo antígeno-anticuerpo con el reactivo de inmunoensayo de acuerdo con la presente invención. Esto es útil para identificar muestras biológicas útiles para la preparación de productos relacionados con la sangre.

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

Las características y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción que sigue cuando se considera junto con las figuras adjuntas.

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 presentes reactivos de ensayo (proteínas y anticuerpos).

La Figura 2 es un mapa circular del vector de expresión de levadura pBS24.1.

La Figura 3 es una representación esquemática del casete de expresión del VHC mutante de turno de acuerdo con la presente invención.

La Figura 4 es un mapa circular del plásmido de expresión mutante de turno pd.4a.t.ns3.1165.KK de acuerdo con la presente invención.

La Figura 5 ilustra el procedimiento de clonación para el plásmido de expresión mutante de turno pd.4a.t.ns3.1165.KK.

La Figura 6 es un dibujo esquemático de un inmunoensayo representativo que utiliza un reactivo de inmunoensayo de acuerdo con la presente invención en el que el reactivo de inmunoensayo está inmovilizado sobre un soporte sólido.

La Figura 7 es un dibujo esquemático de un inmunoensayo representativo que usa reactivo de inmunoensayo y anticuerpo anti-VHC de acuerdo con la presente invención, en el que el reactivo de inmunoensayo y el anticuerpo anti-VHC se inmovilizan sobre un soporte sólido.

Descripción detallada de la invención

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

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

Las siguientes abreviaturas de aminoácidos se utilizan en 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: Su (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

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos y se pretende que se definan como se indica a continuación.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares se incluyen dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como sus fragmentos están incluidos en la definición. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los propósitos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), en la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como por mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como por mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.

Un polipéptido del VHC es un polipéptido, como se definió anteriormente, derivado de la poliproteína del VHC. No es necesario que el polipéptido se derive físicamente del VHC, pero puede producirse de forma 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 o 6 del VHC. Se conocen varias regiones conservadas y variables entre estas cepas y, en general, las secuencias de aminoácidos de los epítomos derivados de estas regiones tendrán un alto grado de homología de secuencia, por ejemplo, homología de secuencia de aminoácidos de más del 30%, preferiblemente más del 40%, cuando las dos secuencias están alineadas. Por lo tanto, por ejemplo, el término polipéptido "NS4a/3" se refiere a NS4a combinada con NS3 de cualquiera de las diversas cepas del VHC, así como análogos de NS4a/3, muteínas y fragmentos inmunogénicos, como se define más adelante. Se conocen los genotipos completos de muchas de estas cepas. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6.150.087 y No. de acceso de GenBank AJ238800 y AJ238799.

Un polipéptido "derivado de" una poliproteína del VHC significa un polipéptido que comprende una secuencia de una

o más regiones o porciones de regiones de la poliproteína del VHC de referencia. Típicamente, el polipéptido está compuesto por regiones o porciones de regiones que incluyen epítomos y generalmente tendrá una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga al polipéptido de referencia, como se define a continuación. Por lo tanto, el término "derivado de" se utiliza para identificar la fuente original de una molécula pero no pretende limitar el método mediante el cual se fabrica la molécula, que puede ser, por ejemplo, mediante síntesis química o medios recombinantes.

Los términos "análogo" y "muteína" se refieren a derivados biológicamente activos de la molécula de referencia, o fragmentos de dichos derivados, que retienen 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 polipeptídica nativa con una o más adiciones, sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora, o en el caso de varias realizaciones de NS3 modificada, de naturaleza no conservadora en el sitio proteolítico activo) y/o eliminaciones de aminoácidos, con respecto a la molécula nativa, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad inmunogénica. El término "muteína" se refiere a polipéptidos que tienen una o más moléculas similares a aminoácidos que incluyen pero no se limitan a compuestos que comprenden solo moléculas de amino y/o imino, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural (por ejemplo, sintético), moléculas cicladas, ramificadas y similares. El término también incluye moléculas que comprenden uno o más residuos de glicina sustituidos en N (un "peptoide") y otros aminoácidos o péptidos sintéticos. (Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.831.005; 5.877.278; y 5.977.301; Nguyen y col., Chem Biol. (2000) 7: 463-473; y Simon y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 9367-9371 para descripciones de peptoides). Preferiblemente, el análogo o muteína tiene al menos la misma inmunoreactividad que la molécula nativa. Los métodos para preparar análogos de polipéptidos y muteínas se conocen en la técnica y se describen más adelante.

Como se explicó anteriormente, los análogos generalmente incluyen sustituciones que son de naturaleza conservadora, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Específicamente, los aminoácidos generalmente se dividen 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 a veces se clasifican como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonablemente predecible que un reemplazo aislado de leucina con isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo conservador similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o incluso hasta aproximadamente 15-25 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o cualquier número entero entre 5-25, siempre y cuando la función deseada de la molécula permanezca intacta. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente las regiones de la molécula de interés que pueden tolerar el cambio haciendo referencia a los gráficos de Hopp/Woods y Kyte-Doolittle, bien conocidos en la técnica.

Por "NS3 modificado" se entiende un polipéptido NS3 modificado con respecto al dominio de NS3 nativo del VHC en el que los residuos de aminoácidos 15 y 16 en la SEQ ID NO: 4 son lisina (K) en lugar de isoleucina (I), y en la que uno o más residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 se modifican de manera que la actividad proteasa del dominio de NS3 modificado del virus de la hepatitis C se inhibe en relación con la actividad proteasa del dominio de NS3 del virus de la hepatitis C que tiene la SEQ ID NO: 4 que carece de las modificaciones. Preferiblemente, la modificación para inhibir la actividad proteasa comprende la sustitución de uno o más de los residuos de aminoácidos 55, 79 y 137 de la SEQ ID NO: 4, preferiblemente una sustitución de alanina o glicina. En una realización preferida, la modificación para inhibir la actividad proteasa comprende la sustitución de alanina por el residuo de aminoácido 137 de la SEQ ID NO: 4.

Por "fragmento" se entiende un polipéptido que consta solo de una parte de la secuencia y estructura del polipéptido de longitud completa intacta. El fragmento puede incluir una eliminación del terminal C y/o una eliminación del terminal N del polipéptido nativo. Un "fragmento inmunogénico" de una proteína del VHC particular generalmente incluirá al menos aproximadamente 5-10 residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, preferiblemente al menos aproximadamente 15-25 residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 20-50 o más residuos de aminoácidos 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 retenga la inmunorreactividad en los ensayos descritos en el presente documento.

El término "epítomo" como se usa en este documento se refiere a una secuencia de al menos aproximadamente 3 a 5, preferiblemente aproximadamente 5 a 10 o 15, y no más de aproximadamente 1.000 aminoácidos (o cualquier número entero entre ellos), que define una secuencia que por sí misma o como parte de una secuencia más grande, se une a un anticuerpo generado en respuesta a dicha secuencia. No existe 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 uso en la presente invención no se limita a un polipéptido que tiene la secuencia exacta de la porción 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 exhiben grados relativamente altos de variabilidad entre aislamientos. Por lo tanto, el término "epítomo" abarca secuencias idénticas a la secuencia nativa, así como modificaciones de la secuencia nativa, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora).

Las regiones de un polipéptido dado que incluyen un epítomo pueden identificarse usando cualquier número de 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, los epítomos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando simultáneamente un gran número de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de proteína y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos todavía están unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998-4002; Geysen y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 178-182; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23: 709-715. Usando tales técnicas, se han identificado varios epítomos del VHC. Véase, por ejemplo, Chien y col., Viral Hepatitis and Liver Disease (1994) páginas 320-324, y más adelante. De manera similar, los epítomos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de los aminoácidos mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, citado más arriba. Las regiones antigénicas de proteínas también se pueden identificar usando gráficos estándar de antigenicidad e hidropatía, tales como los calculados usando, por ejemplo, el programa de software Omiga versión 1.0 disponible a través del Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el método de Hopp/Woods, Hopp y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1981) 78: 3824-3828 para determinar los perfiles de antigenicidad, y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte y col., J. Mol. Biol. (1982) 157: 105-132 para los gráficos de hidropatía.

Como se usa en este documento, el término "epítomo conformacional" se refiere a una porción de una proteína de longitud completa, o un análogo o muteína de la misma, que tiene características estructurales nativas de 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, glicosilación y estructura tridimensional. La longitud de la secuencia que define el epítomo puede estar sujeta a amplias variaciones ya que se cree que estos epítomos están formados por la forma tridimensional del antígeno (por ejemplo, plegamiento). Por lo tanto, los aminoácidos que definen el epítomo pueden ser relativamente pocos en número, pero están ampliamente dispersos a lo largo de la molécula, llevándose a la conformación del epítomo correcta mediante plegamiento. Las porciones del antígeno entre los residuos que definen el epítomo pueden no ser críticas para la estructura conformacional del epítomo. Por ejemplo, la eliminación 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 involucradas en enlaces disulfuro, sitios de glicosilación, etc.).

Los epítomos conformacionales presentes en la región NS4a/3 se identifican fácilmente usando los métodos discutidos anteriormente. Además, la presencia o ausencia de un epítomo conformacional en un polipéptido dado puede determinarse fácilmente mediante el cribado del antígeno de interés con un anticuerpo (suero policlonal o monoclonal para el epítomo conformacional) y comparando su reactividad con la de una versión desnaturalizada del antígeno que retiene solo epítomos lineales (si los hay). En tal cribado usando anticuerpos policlonales, puede ser ventajoso absorber el suero policlonal primero con el antígeno desnaturalizado y ver si retiene anticuerpos contra el antígeno de interés.

Preferiblemente, un epítomo conformacional se produce de forma recombinante y se expresa en una célula de la que se puede extraer en condiciones que conservan sus características estructurales deseadas, por ejemplo, sin desnaturalización 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. Alternativamente, es posible expresar los antígenos y renaturalizar adicionalmente la proteína después de la recuperación. También se entiende que la síntesis química también puede proporcionar mimótipos de antígeno conformacional que reaccionan de forma cruzada con el epítomo conformacional del antígeno nativo.

Un "anticuerpo" ("Ab") se refiere a una molécula que se une específicamente a un epítomo de interés presente en un antígeno. Por "se une específicamente" se entiende que el anticuerpo reconoce e interactúa con el epítomo en un tipo de interacción de "cerradura y llave" para formar un complejo entre el antígeno y el anticuerpo, en oposición a la unión no específica que podría ocurrir entre el anticuerpo y, por ejemplo, el sustrato de prueba. Por lo tanto, por ejemplo, un anticuerpo del núcleo del VHC es una molécula que se une específicamente a la proteína del núcleo del VHC. El término "anticuerpo" como se usa en este documento incluye anticuerpos obtenidos de preparaciones policlonales y monoclonales, así como, lo siguiente: moléculas de anticuerpo híbridas (quiméricas) (véase, por ejemplo, Winter y col., (1991) Nature 349: 293-299 y la patente de los Estados Unidos No. 4.816.567); fragmentos F(ab')₂ y F(ab); moléculas Fv (heterodímeros no covalentes, véase, por ejemplo, Inbar y col. (1972) Proc Natl Acad Sci USA 69: 2659-2662; y Ehrlich y col. (1980) Biochem 19: 4091-4096); moléculas de Fv monocatenarias (sFv) (véase, por ejemplo, Huston y col. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-5883); constructos de fragmentos de anticuerpos diméricos y

triméricos; minicuerpos (véase, por ejemplo, Pack y col., (1992) *Biochem* 31: 1579-1584; Cumber y col., (1992) *J Immunology* 149B: 120-126); moléculas de anticuerpo humanizadas (véase, por ejemplo, Riechmann y col., (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyan y col., (1988) *Science* 239: 1534-1536; y la publicación de patente del Reino Unido No. GB 2.276.169, publicada el 21 de septiembre de 1994); y cualquier fragmento funcional obtenido a partir de dichas moléculas, en el que dichos fragmentos conservan las propiedades de unión inmunológica de la molécula de anticuerpo original.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición de anticuerpos que tiene una población de anticuerpos homogénea. El término no se limita con respecto a la especie o fuente del anticuerpo, ni se pretende que esté limitado por la forma en que se elabora. Por lo tanto, el término abarca anticuerpos obtenidos de hibridomas murinos, así como anticuerpos monoclonales humanos obtenidos utilizando hibridomas humanos en lugar de murinos. Véase, por ejemplo, Cote, y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 1985, página 77.

Por "aislado" se entiende, cuando se hace referencia a un polipéptido, que la molécula indicada está separada y discreta del organismo completo con el que se encuentra la molécula en la naturaleza o está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo.

Por "determinante antigénico equivalente" se entiende un determinante antigénico de diferentes subespecies o cepas del VHC, tales como de las cepas 1, 2 o 3 del VHC. Más específicamente, se conocen epítopos, tales como "5-1-1", que se encuentran aproximadamente en las posiciones 1694-1735, numeradas en relación con la secuencia de poliproteína del VHC-1 (véase la SEQ ID NO: 1), y tales epítopos varían entre las cepas 1, 2 y 3. Por lo tanto, el epítipo 5-1-1 de las tres cepas diferentes son determinantes antigénicos equivalentes y, por lo tanto, son "copias" 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, homología de secuencia de aminoácidos de más del 30%, preferiblemente más del 40%, cuando las dos secuencias están alineadas.

"Homología" se refiere al porcentaje de similitud entre dos polinucleótidos o dos fracciones polipeptídicas. Dos secuencias de ADN o dos polipéptidos son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias exhiben 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 95% -98% de similitud de secuencia en una longitud definida de las moléculas. Como se usa en el presente documento, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran una identidad completa con la secuencia de ADN o polipéptido especificada.

En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, respectivamente. El porcentaje de identidad se puede determinar mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas (la secuencia de referencia y una secuencia con % de identidad desconocido con la secuencia de referencia) alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia de referencia y multiplicando el resultado por 100.

Se pueden usar programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis de homología 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, D.C., que adapta el algoritmo de homología local de Smith and Waterman *Advances in Appl. Math.* 2: 482-489, 1981 para análisis de péptidos. Los programas para determinar la homología de la secuencia de nucleótidos están disponibles en el Paquete de Análisis de Secuencia de Wisconsin, Versión 8 (disponible a través de Genetics Computer Group, Madison, Wis.) 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 predeterminados recomendados por el fabricante y descritos en el Paquete de Análisis de Secuencia de Wisconsin mencionado anteriormente. Por ejemplo, el porcentaje de homología de una secuencia de nucleótidos particular con una secuencia de referencia se puede determinar usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación predeterminada y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Otro método para establecer el porcentaje de homología en el contexto de la presente invención es utilizar el paquete de programas MPSRCH propiedad de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, California). A partir de este conjunto de paquetes, se puede emplear el algoritmo Smith-Waterman en los que se utilizan parámetros predeterminados 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 "homología de secuencia". Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineación es BLAST, usado con parámetros predeterminados. Por ejemplo, BLASTN y BLASTP pueden usarse usando los siguientes parámetros predeterminados: código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; esperar = 10; Matriz = BLOSUM62; descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTUACIÓN ALTA; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB

+ traducciones de CDS del GenBank + SwissProt + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas están fácilmente disponibles.

Alternativamente, la homología se puede determinar mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa o nucleasas específicas de cadena sencilla y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación Southern bajo, por ejemplo, condiciones rigurosas, como se define para ese sistema particular. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro del conocimiento de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., citado más arriba; DNA Cloning, citado más arriba; Nucleic Acid Hybridization, citado más arriba.

Una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación están determinados por un codón de inicio en el terminal 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el terminal 3' (carboxilo). Una secuencia de terminación de la transcripción puede estar localizada 3' con respecto a la secuencia codificante.

"Enlazado operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados para realizar su función deseada. Por lo tanto, un promotor dado operativamente enlazado a una secuencia codificante es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante cuando están presentes los factores de transcripción adecuados, etc. No es necesario que el promotor sea contiguo a la secuencia codificante, siempre que funcione para dirigir la expresión del mismo. Por lo tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias no traducidas pero transcritas entre la secuencia promotora y la secuencia codificante, al igual que los intrones transcritos, y la secuencia promotora todavía puede considerarse "enlazada operativamente" con la secuencia codificante.

"Recombinante", como se usa en este documento para describir una molécula de ácido nucleico, significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, viral, semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociado con la totalidad o una parte del polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza. El término "recombinante", como se usa con respecto a una proteína o polipéptido, significa un polipéptido producido por la expresión de un polinucleótido recombinante. En general, el gen de interés se clona y luego se expresa en organismos transformados, como se describe más adelante. El organismo huésped expresa el gen extraño para producir la proteína en condiciones de expresión.

Un "elemento de control" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que ayuda en la expresión de una secuencia codificante a la que está enlazado. El término incluye promotores, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores secuencia arriba, señales de poliadenilación, regiones no traducidas, que incluyen 5'-UTR y 3'-UTR y, cuando sea apropiado, secuencias líder y potenciadoras, que colectivamente proporcionan la transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula huésped.

Un "promotor", como se usa en este documento, es una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula huésped e iniciar la transcripción de una secuencia codificante secuencia abajo (dirección 3') enlazada operativamente a la misma. Para los fines de la presente invención, una secuencia promotora incluye el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción de un gen de interés a niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora hay un sitio de inicio de la transcripción, así como dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas a menudo, pero no siempre, contienen cajas "TATA" y cajas "CAT".

Una secuencia de control "dirige la transcripción" de una secuencia codificante en una célula cuando la ARN polimerasa se unirá a la secuencia promotora y transcribirá la secuencia codificante en ARNm, que luego se traduce en el polipéptido codificado por la secuencia codificante.

"Casete de expresión" o "constructo de expresión" se refiere a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de la secuencia o secuencias o gen o genes de interés. El casete de expresión incluye elementos de control, como se describió anteriormente, tales como un promotor que está operativamente enlazado a (para dirigir la transcripción de) la secuencia o secuencias o gen o genes de interés, y a menudo incluye también una secuencia de poliadenilación. Dentro de ciertas realizaciones de la invención, el casete de expresión descrito en este documento puede estar contenido dentro de un constructo de plásmido. Además de los componentes del casete de expresión, el constructo de plásmido también puede incluir, uno o más marcadores seleccionables, una señal que permite que el constructo de plásmido exista como ADN monocatenario (por ejemplo, un origen de replicación M13), al menos una sitio de clonación múltiple y un origen de replicación de "mamífero" (por ejemplo, un origen de replicación de SV40 o adenovirus).

"Transformación", como se usa en este documento, se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, independientemente del método usado para la inserción: por ejemplo, transformación por absorción

directa, transfección, infección y similares. Para métodos particulares de transfección, véase más abajo. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un episoma, o alternativamente, puede integrarse en el genoma del huésped.

- 5 Una "célula huésped" es una célula que ha sido transformada, o es capaz de transformarse, por una secuencia de ADN exógena.

10 Como se usa en este documento, una "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o líquido fluido de un sujeto, que comúnmente incluye anticuerpos producidos por el sujeto o antígenos presentes en el sujeto. Las muestras típicas que incluyen tales anticuerpos y/o antígenos se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, sangre, plasma, suero, materia fecal, orina, médula ósea, bilis, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, muestras de piel, secreciones de la piel, los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias y también muestras de constituyentes de cultivos celulares *in vitro*, incluidos, entre otros, medios acondicionados resultantes del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo, células recombinantes y componentes celulares.

15 "Soporte sólido" se refiere a una matriz sólida a la que los polipéptidos del VHC usados en los inmunoensayos en cuestión (y/o los antígenos del VHC en los ensayos de combinación de la invención en cuestión) se unen covalentemente o por medios no covalentes tales como adsorción hidrófoba.

20 "Inmunológicamente reactivo" o "inmunorreactivo" significa que el antígeno en cuestión reaccionará específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC, y/o que los anticuerpos anti-VHC en cuestión reaccionarán específicamente con el antígeno del VHC presente en una muestra biológica de un individuo infectado por el VHC.

25 "Inmunogénico" pretende que el antígeno en cuestión provoque una reacción inmunitaria cuando se administre a un individuo.

30 "Complejo inmune" se refiere a la combinación formada cuando un anticuerpo se une a un epítipo en un antígeno.

35 Como se usa en el presente documento, los términos "marcador" y "marcador detectable" se refieren a una molécula capaz de detectar, incluidos, entre otros, isótopos radiactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromóforos, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores de enzimas, cromóforos, colorantes, iones metálicos, sales metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina, avidina, estreptavidina o haptenos) y similares. El término "fluorescente" se refiere a una sustancia o una porción de la misma que es capaz de exhibir fluorescencia en el intervalo detectable. Los ejemplos particulares de marcadores que se pueden usar bajo la invención incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante (HRP), fluoresceína, FITC, rodamina, dansilo, umbeliferona, éster de dimetil acridinio (DMAE), rojo Texas, luminol, NADPH y alfa, beta-galactosidasa.

40 II. Modos de realización de la invención

45 Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a formulaciones particulares o parámetros de proceso ya que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares de la invención solamente, y no pretende ser limitante.

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

55 Como se señaló anteriormente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que el uso de un polipéptido NS4a/NS3 modificado del VHC proporciona reactivos superiores para detectar la infección por VHC. Los polipéptidos NS4a/NS3 modificado retienen los epítopos de conformación y, por lo tanto, la inmunorreactividad y, por lo tanto, pueden usarse solos o en combinación con otros reactivos del VHC para detectar con precisión y eficacia la presencia de infección por VHC. Los ensayos descritos en el presente documento pueden usarse para detectar la infección por VHC causada por cualquiera de los seis genotipos conocidos del VHC. Los polipéptidos NS4a/NS3 modificado son especialmente útiles en métodos de diagnóstico para detectar con precisión una infección temprana por VHC. Los métodos se pueden utilizar para detectar la infección por VHC durante las primeras etapas de la seroconversión del VHC, aumentando así la precisión de la detección y reduciendo la incidencia de resultados falsos.

60 Los polipéptidos NS4a/NS3 modificado pueden usarse solos en inmunoensayos o en combinación con otros antígenos del VHC, ya sea del mismo o de diferentes genotipos y aislados del VHC, por ejemplo, epítopos principales de secuencias del núcleo del VHC, E1, E2, NS3, 5-1-1, c100-3 y NS5. Los métodos se pueden practicar convenientemente en un solo ensayo, utilizando cualquiera de los varios formatos de ensayo descritos a continuación, tales como, entre otros, formatos de ensayo que utilizan un soporte sólido al cual se unen los antígenos del VHC (y/o los anticuerpos anti-VHC).

Con el fin de comprender mejor la invención, a continuación se proporciona una discusión más detallada con respecto a los polipéptidos NS4a/NS3 modificado, así como la producción de las proteínas y los métodos de uso de las proteínas.

5 Proteínas del VHC

Los genomas de las cepas del VHC contienen un único marco de lectura abierto de aproximadamente 9.000 a 12.000 nucleótidos, que se transcriben en una poliproteína. Como se muestra en la Figura 1 y Tabla 1, una poliproteína del VHC, tras la escisión, produce al menos diez productos distintos, en el siguiente orden: NH₂-núcleo-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. El polipéptido del núcleo se encuentra en las posiciones 1-191 de la SEQ ID NO: 1, numeradas en relación con VHC-1 (véase, Choo y col., (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 de la SEQ ID NO: 1. Los polipéptidos de la envoltura, E1 y E2, se encuentran aproximadamente en las posiciones 192-383 de la SEQ ID NO: 1 y 384-746 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente. El dominio P7 se encuentra aproximadamente en las posiciones 747-809 de la SEQ ID NO: 1. NS2 es una proteína de membrana integral con actividad proteolítica y se encuentra aproximadamente en las posiciones 810-1026 de la SEQ ID NO: 1 de la poliproteína. NS2, en combinación con NS3 (que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1027-1657 de la SEQ ID NO: 1), escinde el enlace escindible NS2-NS3 que a su vez genera el terminal N del NS3 y libera una poliproteína grande que incluye tanto las actividades de la serina proteasa como de la ARN helicasa. La proteasa NS3, que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1027-1207 de la SEQ ID NO: 1, sirve para procesar la poliproteína restante. La actividad helicasa se encuentra aproximadamente en las posiciones 1193-1657 de la SEQ ID NO: 1. NS3 libera un cofactor de NS3 (NS4a, que se encuentra en las posiciones 1658-1711 de la SEQ ID NO: 1), dos proteínas (NS4b que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1712-1972 de la SEQ ID NO: 1 y NS5a que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1973-2420 de la SEQ ID NO: 1) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5b que se encuentra aproximadamente en las posiciones 2421-3011 de la SEQ ID NO: 1). La finalización de la maduración de la poliproteína se inicia mediante la escisión autocatalítica en la unión NS3-NS4a, catalizada por la serina proteasa NS3.

Los polipéptidos NS3 modificados de la invención están mutados con respecto al dominio de NS3 nativo del VHC en el sentido de que los residuos de aminoácidos 15 y 16 en la SEQ ID NO: 4 son lisina (K) en lugar de isoleucina (I). Esta sustitución de residuos de aminoácidos hidrófilos por residuos de aminoácidos hidrófobos produce una forma más soluble y estable de reactivo de inmunoensayo de acuerdo con la presente invención.

Los polipéptidos NS3 modificados de la invención también se mutan para inhibir la actividad proteasa, de manera que la escisión adicional de un polipéptido que incluye el dominio de NS3 modificado, tal como un polipéptido NS4a/3, así como la escisión catalítica de proteínas del VHC adicionales utilizadas en combinación con el polipéptido NS3 modificado se inhibe. El polipéptido NS3 se puede modificar mediante la eliminación de todo o una parte del dominio de proteasa NS3. Alternativamente, la actividad proteolítica se puede inhibir mediante la sustitución de aminoácidos dentro de las regiones activas del dominio de proteasa. Finalmente, las adiciones de aminoácidos a las regiones activas del dominio, de manera que se modifique el sitio catalítico, también servirán para inhibir la actividad proteolítica. Preferiblemente, las modificaciones realizadas para reducir o eliminar la actividad proteasa no alteran los epítomos conformacionales en las proteínas NS3 o NS4a/3 nativas.

Como se explicó anteriormente, la actividad proteasa se encuentra en aproximadamente las posiciones de aminoácidos 1027-1207 de la SEQ ID NO: 1, numeradas en relación con la poliproteína del VHC-1 de longitud completa (véase, Choo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 2451-2455). Se conocen la estructura de la proteasa NS3 y el sitio activo. Véase, por ejemplo, Lin, "VHC NS3-4A Serine Proteases" en "Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology", Ed. S.L. Tan, Horizon Bioscience (2006); Kim y col., Cell (1996) 87: 343-355; Tomei y col., J Virology (1993) 67 (7): 4017-4026; De Francesco y col., Antivir. Ther. (1998) 3: 99-109; Koch y col., Biochemistry (2001) 40: 631-640. Por lo tanto, las eliminaciones o modificaciones de la secuencia nativa se producirán típicamente en o cerca del sitio activo de la molécula. Las modificaciones preferidas son para la tríada catalítica en el sitio activo de la proteasa, es decir, los residuos H, D y/o S, con el fin de inactivar la proteasa. Estos residuos se producen en las posiciones His¹⁰⁸³, Asp¹¹⁰⁷ y Ser¹¹⁶⁵ de la tríada catalítica en la SEQ ID NO: 1, respectivamente, numeradas en relación con la poliproteína del VHC de longitud completa (posiciones 55, 79 y 137, respectivamente, de la SEQ ID NO: 4). Tales modificaciones suprimirán la actividad de escisión proteolítica de la proteasa NS3 mientras mantienen la inmunorreactividad. Las sustituciones particularmente preferidas son de naturaleza no conservadora y neutra, tal como una sustitución de Ala o glicina por uno o más de los residuos de aminoácidos que se encuentran normalmente en las posiciones 1083, 1107 y 1165 de la SEQ ID NO: 1 del dominio de proteasa (posiciones 55, 79 y 137, respectivamente, de la SEQ ID NO: 4). Un experto en la técnica puede determinar fácilmente porciones de la proteasa NS3 a eliminar para interrumpir la actividad.

Además, un experto en la técnica puede determinar fácilmente otras modificaciones de aminoácidos apropiadas en estos sitios basándose en la estructura y función conocidas de la proteasa NS3 del VHC como se describe en, por ejemplo, De Francesco y col., Antivir. Ther. (1998) 3 (Supl. 3): 99-109; y Schechter y Berger, Biochim. Biophys. Res. Commun. (1967) 27: 157-162. En particular, se sabe que la proteasa NS3 es una serina proteasa y el mecanismo proteolítico se basa en el ataque nucleofílico del enlace peptídico dirigido por una serina. En muchos casos, la

propiedad nucleofílica del grupo mejora con la presencia de una histidina, mantenida en un "estado aceptor de protones" por un aspartato. Las cadenas laterales alineadas de serina, histidina y aspartato forman la tríada catalítica común a la mayoría de las serina proteasas. El sitio activo de las serina proteasas tiene la forma de una hendidura en la que se une el sustrato polipeptídico. Schechter y Berger, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* (1967) 27: 157-162

5 residuos de aminoácidos marcados desde el terminal N al C del sustrato polipeptídico (Pi, ..., P3, P2, P1, P1', P2', P3', ..., Pj) y sus respectivos subsitios de unión (Si, ..., S3, S2, S1, S1', S2', S3', ..., Sj) y encontraron que la escisión se cataliza entre P1 y P1'. La proteasa NS3 adopta un pliegue similar a la quimotripsina e incluye un sitio de unión al sustrato expuesto al disolvente muy largo, de acuerdo con el requisito de sustratos de péptidos muy largos (P6-P4'). La proteasa NS3 tiene preferencia por los residuos de cisteína en la posición del sustrato PI. Por lo tanto, basándose

10 en la estructura y función conocidas descritas anteriormente y en la técnica, un experto en la técnica puede determinar fácilmente otras sustituciones, adiciones y eliminaciones de aminoácidos que servirán para interrumpir la actividad proteolítica de la proteasa NS3.

La presencia o ausencia de actividad proteolítica de NS3 se puede determinar usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la actividad proteasa o la falta de la misma se puede determinar usando el procedimiento descrito a continuación en los ejemplos, así como usando ensayos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Takeshita y col., *Anal. Biochem.* (1997) 247: 242-246; Kakiuchi y col., *J. Biochem.* (1997) 122: 749-755; Sali y col., *Biochemistry* (1998) 37: 3392-3401; Cho y col., *J. Virol. Meth.* (1998) 72: 109-115; Cerretani y col., *Anal. Biochem.* (1999) 266: 192-197; Zhang y col., *Anal. Biochem.* (1999) 270: 268-275; Kakiuchi y col., *J. Virol. Meth.* (1999)

20 80: 77 - 84; Fowler y col., *J. Biomol. Screen.* (2000) 5: 153-158; y Kim y col., *Anal. Biochem.* (2000) 284: 42-48.

Se han determinado secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de varias cepas y aislados del VHC, incluidas secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de las diversas regiones de la poliproteína del VHC, que incluyen genes y polipéptidos del Núcleo, NS2, p7, E1, E2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b. Por ejemplo, el VHC J1.1 aislado se describe en Kubo y col., (1989) *Japan. Nucl. Acids Res.* 17: 10367-10372; Takeuchi y col. (1990) *Gene* 91: 287-291; Takeuchi y col. (1990) *J. Gen. Virol.* 71: 3027-3033; y Takeuchi y col., (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 4626. Las secuencias codificantes completas de dos aislados independientes, VHC-J y BK, son descritas por Kato y col., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9524-9528 y Takamizawa y col., (1991) *J. Virol.* 65: 1105-1113 respectivamente.

25

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

30

35

La secuencia de aminoácidos de un polipéptido NS4a/NS3 modificado de acuerdo con la presente invención se muestra en la SEQ ID NO: 2. La secuencia incluye, en la dirección del terminal N al terminal C, un Met en el terminal N, los aminoácidos 2-14 son NS4a, seguidos de los aminoácidos intermedios SGS, seguidos de los aminoácidos 18-646 que son NS3 modificados (los aminoácidos 32 y 33 son lisina y el aminoácido 154 es alanina).

40

Anticuerpos anti-VHC

Los anticuerpos anti-VHC (dirigidos contra el mismo o diferentes epítomos del dominio del VHC) pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos del núcleo anti-VHC. Los ejemplos de anticuerpos anti-núcleo particulares útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales, dirigidos contra epítomos en la región del núcleo que se encuentran entre los aminoácidos 10-53 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 10-45 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 67-88 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 120-130 de la SEQ ID NO: 1, o anticuerpos dirigidos contra cualquiera de los epítomos del núcleo identificados, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 6.630.298; patente de los Estados Unidos No. 6.150.087; patente de los Estados Unidos No. 6.346.375; Houghton y col., patente de los Estados Unidos No. 5.350.671; Chien y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89: 10011-10015; Chien y col., *J. Gastroent. Hepatol.* (1993) 8: S33 - 39; Chien y col., publicación internacional No. WO 93/00365; y Chien, D.Y., publicación internacional No. WO 94/01778.

45

50

En una realización de la invención, representada en la FIG. 6, se realiza un inmunoensayo de ligando de captura rápida usando un polipéptido NS4a/NS3 modificado. La muestra se combina con los antígenos, que pueden estar presentes en un soporte sólido, como se describe más adelante. Si la muestra está infectada con el VHC, los anticuerpos del VHC contra los epítomos presentes en el soporte sólido se unirán a los componentes del soporte sólido. La detección se realiza mediante la unión de un marcador detectable (tal como peroxidasa de rábano picante (HRP) como se muestra en la Figura 6) a un miembro del complejo antígeno/anticuerpo. La unión puede ser por medios covalentes o mediante unión posterior de anticuerpos marcados de forma detectable, como en un ensayo tipo sándwich estándar, o mediante reacción enzimática, cuyo producto es detectable. El marcador detectable puede incluir, pero no se limita a, un cromóforo, un anticuerpo, un antígeno, una enzima, un compuesto reactivo con enzima cuyo producto de escisión es detectable, rodamina o derivado de rodamina, biotina, avidina, estreptavidina, un compuesto fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, tal como éster de dimetil acridinio (DMAE), derivados y/o

60

65

combinaciones de estos marcadores. Puede usarse convenientemente un anticuerpo anti-humano marcado de forma detectable, capaz de detectar una molécula de IgG humana presente.

En otra realización de la invención, representada en la FIG. 7, se realiza un inmunoensayo de ligando de captura rápida usando un polipéptido NS4a/NS3 modificado y un anticuerpo anti-VHC. La muestra se combina con el polipéptido y el anticuerpo anti-VHC, que pueden estar presentes en un soporte sólido, como se describe más adelante. Si la muestra está infectada con el VHC, los anticuerpos del VHC contra los epítomos presentes en el soporte sólido se unirán a los componentes del soporte sólido, y el antígeno del VHC inmunológicamente reactivo con los epítomos de anticuerpos en el soporte sólido también se unirá a los componentes del soporte sólido. La detección se realiza mediante la unión de un marcador detectable (tal como peroxidasa de rábano picante (HRP) como se muestra en la Figura 7) a un miembro del complejo antígeno/anticuerpo. La unión puede ser por medios covalentes o mediante unión posterior de anticuerpos marcados de forma detectable, tal como en un ensayo tipo sándwich estándar, o mediante reacción enzimática, cuyo producto es detectable. El marcador detectable puede incluir, pero no se limita a, un cromóforo, un anticuerpo, un antígeno, una enzima, un compuesto reactivo con enzima cuyo producto de escisión es detectable, rodamina o derivado de rodamina, biotina, avidina, estreptavidina, un compuesto fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, tal como éster de dimetil acridinio (DMAE), derivados y/o combinaciones de estos marcadores. Puede usarse convenientemente un anticuerpo anti-humano marcado de forma detectable, capaz de detectar una molécula de IgG humana presente.

Dicho ensayo es un ensayo de combinación del VHC, capaz de detectar tanto el antígeno del VHC como el anticuerpo del VHC que pueden estar presentes en una muestra biológica de un individuo infectado con el VHC.

Producción de antígenos del VHC

Como se explicó anteriormente, las moléculas de la presente invención se producen generalmente de forma recombinante. Por tanto, los polinucleótidos que codifican antígenos del VHC para usar con la presente invención pueden prepararse usando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos que codifican las moléculas descritas anteriormente se pueden obtener usando métodos recombinantes, tales como cribado de ADNc y bibliotecas genómicas de células que expresan el gen, o derivando el gen 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 el arte, tales como en Houghton y col., patente de los Estados Unidos No. 5.350.671. El gen de interés también puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse. Las moléculas se pueden diseñar con codones apropiados para la secuencia particular. A continuación, la secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados mediante métodos estándar y se ensambla en una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge (1981) *Nature* 292: 756; Nambair y col. (1984) *Science* 223: 1299; y Jay y col., (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 6311.

Por tanto, se pueden obtener secuencias de nucleótidos particulares a partir de vectores que albergan las secuencias deseadas o sintetizadas total o parcialmente utilizando 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) según sea apropiado. Véase, por ejemplo, Sambrook, citado anteriormente. En particular, un método para obtener secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias deseadas es hibridar conjuntos complementarios de oligonucleótidos sintéticos solapantes producidos en un sintetizador de polinucleótidos automatizado convencional, seguido de ligación con una ADN ligasa apropiada y amplificación de la secuencia de nucleótidos ligada mediante PVR. Véase, por ejemplo, Jayaraman y col., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4084-4088. Además, síntesis dirigida por oligonucleótidos (Jones y col., (1986) *Nature* 54: 75-82), mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de regiones de nucleótidos preexistentes (Riechmann y col., (1988) *Nature* 332: 323-327 y Verhoeven y col., (1988) *Science* 239: 1534-1536), y el llenado enzimático de oligonucleótidos con huecos usando ADN polimerasa T4 (Queen y col., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033) puede utilizarse según la invención para proporcionar moléculas que tienen capacidades de unión a antígenos alteradas o mejoradas y/o inmunogenicidad reducida.

Los métodos para producir mutantes o análogos de la secuencia de nucleótidos deseada, tales como NS3, u otros antígenos del VHC, son bien conocidos. Véase, por ejemplo, Dasmahapatra y col., patente de los Estados Unidos No. 5.843.752 y Zhang y col., patente de los Estados Unidos No. 5.990.276. La NS3 modificada y otras proteínas del VHC para su uso en inmunoensayos pueden prepararse mediante la eliminación 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. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos, tales como mutagénesis dirigida al sitio y similares, son bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., citado anteriormente; Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 448; Geisselsoder y col. (1987) *BioTechniques* 5: 786; Zoller y Smith (1983) *Methods Enzymol.* 100: 468; Dalbie-McFarland y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6409.

Una vez que se han preparado o aislado las secuencias codificantes, dichas secuencias se pueden clonar 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 no se limitan a, plásmidos, fagos, transposones, cósmidos, cromosomas o virus que son capaces de replicarse cuando se asocian

con los elementos de control adecuados.

La secuencia de codificación se coloca luego bajo el control de elementos de control adecuados, dependiendo del sistema que se utilizará para la expresión. Por tanto, la secuencia codificante se puede colocar bajo el control de un promotor, un sitio de unión al ribosoma (para la expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador, de modo que la secuencia de ADN de interés se transcriba en ARN mediante un transformante adecuado. La secuencia codificante puede contener o no un péptido señal o una secuencia líder que luego puede ser eliminada por el hospedador en el procesamiento postraduccional. Véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.431.739; 4.425.437; 4.338.397.

Además de las secuencias de control, puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión de las secuencias en relación con el crecimiento de la célula huésped. Las secuencias reguladoras son conocidas por los expertos en la técnica, y los ejemplos incluyen aquellas que hacen que la expresión de un gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. También pueden estar presentes en el vector otros tipos de elementos reguladores. Por ejemplo, los elementos potenciadores pueden usarse en este documento para aumentar los niveles de expresión de los constructos. Los ejemplos incluyen el potenciador del gen temprano SV40 (Dijkema y col., (1985) EMBO J. 4: 761), el potenciador/promotor derivado de la repetición terminal larga (RTL) del virus del sarcoma de Rous (Gorman y col., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6777) y elementos derivados del CMV humano (Boshart y col., (1985) Cell 41: 521), tales como elementos incluidos en la secuencia del intrón A del CMV (patente de Estados Unidos No. 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 alto número de copias y un promotor fuerte.

Se construye un vector de expresión de modo que la secuencia codificante particular se localice en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas, siendo el posicionamiento y orientación de la secuencia codificante con respecto a las secuencias de control 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 para 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 se pueden ligar a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector. Alternativamente, la secuencia codificante puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

Las moléculas se pueden expresar en una amplia variedad de sistemas, incluidos los sistemas de expresión de insectos, mamíferos, bacterias, virus y levaduras, todos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los sistemas de expresión de células de insectos, como los sistemas de baculovirus, son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987). Los materiales y métodos para los sistemas de expresión de baculovirus/células de insectos están disponibles comercialmente en forma de kit, entre otros, de Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac"). De manera similar, los sistemas de expresión de células bacterianas y de mamíferos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., citado anteriormente. Los sistemas de expresión de levadura también se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Yeast Genetic Engineering (Barr y col., Eds., 1989) Butterworths, Londres.

También se conocen varias células huésped apropiadas para su uso con los sistemas anteriores. Por ejemplo, las líneas celulares de mamíferos son conocidas en la técnica e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), tales como, pero sin limitarse a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (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 como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus* spp., encontrarán uso con los presentes constructos de expresión. Los huéspedes de levadura 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 usar con vectores de expresión de baculovirus incluyen, entre otras, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.

Las moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos de interés pueden integrarse de forma estable en el genoma de una célula huésped o mantenerse en un elemento episomal estable en una célula huésped adecuada utilizando diversas técnicas de administración de genes bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.399.346.

Dependiendo del sistema de expresión y huésped seleccionado, las moléculas se producen mediante el crecimiento de células huésped transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente en condiciones en las que se expresa la proteína. A continuación, la proteína expresada se aísla de las células huésped y se purifica. Si el sistema

de expresión secreta la proteína en un medio de crecimiento, el producto puede purificarse directamente del medio. Si no se secreta, puede aislarse de los lisados celulares. La selección de las condiciones de crecimiento y los métodos de recuperación apropiados está dentro del conocimiento de la técnica.

Se ha descrito la producción recombinante de varios antígenos del VHC. Véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales Nos. WO 94/01778, WO 93/00365, WO 04/00547 y WO 01/38360; patentes de los Estados Unidos Nos. 5.350.671, 5.683.864, 6.346.375, 6.150.087, 6.514.731, 6.428.792 y 6.632.601; Chien y col., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33 - 39; Chien, D. Y., publicación internacional No. WO 94/01778; Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10011-10015. A continuación se describe un método preferido para producir polipéptidos NS4a/NS3 modificados.

Ensayos de inmunodiagnóstico

Una vez producidos, los antígenos del VHC se pueden utilizar en prácticamente cualquier formato de ensayo que emplee un antígeno conocido para detectar anticuerpos. Una característica común de todos estos ensayos es que el antígeno se pone en contacto con la muestra biológica que se sospecha que contiene anticuerpos del VHC en condiciones que permiten que el antígeno se una a dichos anticuerpos presentes en la muestra. Tales condiciones serán típicamente temperatura fisiológica, pH y fuerza iónica usando un exceso de antígeno. La incubación del antígeno con la muestra va seguida de la detección de complejos inmunes compuestos por el antígeno.

El diseño de los inmunoensayos está sujeto a una gran cantidad de variación y se conocen muchos formatos en la técnica. Los protocolos pueden, por ejemplo, utilizar soportes sólidos o inmunoprecipitación. La mayoría de los ensayos implican el uso de polipéptidos o anticuerpos marcados; los marcadores pueden ser, por ejemplo, moléculas enzimáticas, fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas o colorantes, como se discutió en detalle anteriormente. También se conocen ensayos que amplifican las señales del complejo inmune; ejemplos de los cuales son ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos mediados y marcados con enzimas, tales como ensayos ELISA.

El inmunoensayo puede ser, sin limitación, un formato heterogéneo u homogéneo, y de tipo estándar o competitivo. En un formato heterogéneo, el polipéptido se une típicamente a una matriz sólida o soporte para facilitar la separación de la muestra del polipéptido después de la incubación. Un soporte sólido, para los propósitos de esta invención, puede ser cualquier material que sea una matriz insoluble y pueda tener una superficie rígida o semirrígida. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pozo de microvaloración); cloruro de polivinilo (por ejemplo, láminas o pozos de microvaloración); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microvaloración); fluoruro de polivinilidina; papel diazotizado; membranas de nailon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles y similares. Los soportes particulares incluyen placas, gránulos, discos, capilares, fibras huecas, agujas, alfileres, fibras sólidas, perlas de celulosa, perlas de vidrio poroso, geles de sílice, perlas de poliestireno opcionalmente entrecruzadas con divinilbenceno, perlas de copoliéstericas injertadas, perlas de poliácridamida, perlas de látex, perlas de dimetilacrilamida opcionalmente entrecruzadas con N-N'-bis-acriloleilendiamina y partículas de vidrio recubiertas con un polímero hidrófobo.

Si se desea, las moléculas que se van a añadir al soporte sólido se pueden funcionalizar fácilmente para crear fracciones de estireno o acrilato, permitiendo así la incorporación de las moléculas en poliestireno, poliácridato u otros polímeros como poliimida, poliácridamida, polietileno, polivinilo, polidiacetileno, polifenileno-vinileno, polipéptido, polisacárido, polisulfona, polipirrol, polimidazol, politiofeno, poliéter, epóxidos, vidrio de sílice, gel de sílice, siloxano, polifosfato, hidrogel, agarosa, celulosa y similares.

Si se usa más de un antígeno del VHC en los ensayos, por ejemplo, un polipéptido NS4a/NS3 modificado y otro antígeno del VHC, los antígenos se pueden proporcionar en el mismo sustrato sólido o en diferentes sustratos sólidos que se combinan en el ensayo. Por lo tanto, por ejemplo, los antígenos pueden estar presentes como entidades discretas, por ejemplo, en una placa, o pueden estar presentes, por ejemplo, en micropérlas individuales que se añaden juntas para su uso en el ensayo de interés.

En un contexto, como se muestra en la FIG. 6, primero se hace reaccionar un soporte sólido con los antígenos del VHC, tales como un polipéptido NS4a/NS3 modificado (denominados colectivamente "los componentes de fase sólida" en el presente documento), en condiciones de unión adecuadas de modo que las moléculas estén suficientemente inmovilizadas en el soporte. A veces, la inmovilización del soporte se puede mejorar acoplando primero el antígeno a una proteína con mejores propiedades de unión a la fase sólida. Las proteínas de acoplamiento adecuadas incluyen, pero no se limitan a, macromoléculas tales como albúmina de suero que incluyen albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la técnica. Otros reactivos que se pueden usar para unir moléculas al soporte incluyen polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y similares. Tales moléculas y métodos para acoplar estas moléculas a antígenos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Brinkley, M. A. (1992) Bioconjugate Chem. 3: 2-13; Hashida y col. (1984) J. Appl. Biochem. 6: 56-63; y Anjaneyulu y Staros (1987) International J. of Peptide and Protein Res. 30: 117-124.

Después de hacer reaccionar el soporte sólido con los componentes de fase sólida, cualquier componente de fase

sólida no inmovilizado se elimina del soporte mediante lavado, y los componentes unidos al soporte se ponen en contacto con una muestra biológica que se sospecha que contiene anticuerpos del VHC (denominada colectivamente "moléculas de ligando" en este documento) en condiciones de unión adecuadas. Si hay anticuerpos del VHC presentes en la muestra, formarán un complejo con los antígenos del VHC. Después de lavar para eliminar cualquier molécula de ligando no unida, se añaden anticuerpos marcados de forma detectable, tales como anticuerpos anti-xenogénicos (por ejemplo, anti-humanos), que reconocen un epítipo en los anticuerpos anti-VHC. Estos anticuerpos se unen debido a la formación de complejos.

En un formato de ensayo adicional, bien conocido en la técnica, se hace reaccionar un soporte sólido recubierto de estreptavidina con anticuerpos marcados con biotina que se unen a la NS3 modificada. La muestra biológica se agrega en condiciones de unión adecuadas. Si hay anticuerpos del VHC presentes en la muestra, formarán un complejo con los antígenos del VHC. Después de lavar para eliminar cualquier molécula de ligando no unida, se añaden anticuerpos marcados de forma detectable, como se describió anteriormente.

En un formato homogéneo, la muestra de prueba se incuba con la combinación de antígenos en solución. Por ejemplo, puede ser en condiciones que precipiten cualquier complejo antígeno-anticuerpo que se forme. También se conocen en la técnica formatos tanto estándar como competitivos para ensayos homogéneos.

En un formato estándar, la cantidad de anticuerpos del VHC que forman el complejo anticuerpo-antígeno se controla directamente. Esto se puede lograr determinando si los anticuerpos anti-xenogénicos (por ejemplo, anti-humanos) marcados que reconocen un epítipo en los anticuerpos anti-VHC se unirán debido a la formación del complejo. En un formato competitivo, la cantidad de anticuerpos contra el VHC en la muestra se deduce controlando el efecto competitivo sobre la unión de una cantidad conocida de anticuerpo marcado (u otro ligando competidor) en el complejo.

Más particularmente, los complejos formados que comprenden anticuerpo anti-VHC (o, en el caso de ensayos competitivos, la cantidad de anticuerpo competidor) se detectan mediante cualquiera de varias técnicas conocidas, dependiendo del formato. Por ejemplo, los anticuerpos del VHC no marcados en el complejo pueden detectarse usando un conjugado de Ig antixenogénica complejada con un marcador (por ejemplo, un marcador de enzima). En un formato de ensayo de inmunoprecipitación o aglutinación, la reacción entre los antígenos del VHC y el anticuerpo forma una red que precipita de la solución o suspensión y forma una capa o película visible de precipitado. Si no hay ningún anticuerpo anti-VHC presente en la muestra biológica, no se forma un precipitado visible. Los reactivos de ensayo descritos anteriormente, incluido el soporte sólido de inmunoensayo con anticuerpos y antígenos unidos, así como los anticuerpos y antígenos que deben reaccionar con la muestra capturada, se pueden proporcionar en kits, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, para realizar inmunoensayos como se describió anteriormente. El kit normalmente contendrá en recipientes separados la combinación de antígenos y/o anticuerpos (que pueden estar unidos a un soporte sólido o separados con reactivos para unirlos al soporte sólido), anticuerpos de control y/o formulaciones de antígenos (positivos y/o negativos), anticuerpo y/o antígeno marcado cuando el formato del ensayo lo requiere y reactivos generadores de señal (por ejemplo, sustrato enzimático) si el marcador no genera una señal directamente. Las instrucciones (por ejemplo, escritas, en cinta, VCR, CD-ROM, etc.) para realizar el ensayo normalmente se incluirán en el kit. El kit también puede contener, dependiendo del inmunoensayo particular utilizado, otros reactivos y materiales empacados (es decir, tampones de lavado y similares). Se pueden realizar inmunoensayos estándar, como los descritos anteriormente, utilizando estos kits.

Asimismo, los anticuerpos anti-VHC también pueden usarse en prácticamente cualquier formato de ensayo que emplee un anticuerpo conocido para detectar antígenos, en combinación con un antígeno conocido para detectar anticuerpos. Como se muestra en la Figura 7, el soporte sólido se hace reaccionar con el antígeno del VHC (mostrado como polipéptido NS4a/NS3 modificado) y también con el anticuerpo anti-núcleo del VHC.

III. Experimental

A continuación se muestran ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen sólo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, deberían tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales.

Clonación, expresión y purificación de un antígeno conformacional del polipéptido NS4a/NS3 modificado para mejorar la sensibilidad de un inmunoensayo para la detección temprana de anticuerpos específicos del virus de la hepatitis C.

Se modificó genéticamente una serina proteasa mutante NS4a/NS3.KK del VHC para la expresión directa en *S. cerevisiae* (cepa AD3). El casete de expresión se clonó en el vector de expresión de levadura pBS24.1 (Figura 2). El vector lanzadera de levadura pBS24.1 contiene secuencias de 2 μ para la replicación autónoma en levadura y los genes de levadura leu2-d y URA-3 como marcadores seleccionables. El gen de la β -lactamasa y el origen de replicación de ColE1 son necesarios para la replicación del plásmido en bacterias. El antígeno/proteína se expresa bajo el control del promotor híbrido ADH2/GAPDH. El antígeno mutante NS4a/NS3.KK (véase la Figura 3) utiliza un

segmento de 13 aa de la proteína NS4a (llamado dominio mínimo) unido al terminal N de la NS3 a través de una secuencia flexible SGS (Ser-Gly-Ser). Esta secuencia permite que la NS4a se pliegue en el bolsillo dentro de la proteasa para crear una molécula enzimáticamente activa. Para evitar la autohidrólisis debido a la actividad proteasa de NS3, se mutó Ser1165 (de la SEQ ID NO: 1) de la tríada catalítica de la proteasa a Ala, como se describió previamente en el documento US 7.491.808 B2. Además, se introdujeron un par de residuos Lys cargados en el terminal N de la proteasa (aa 1043 y 1044 del VHC de la SEQ ID NO: 1), reemplazando los residuos Ile, para mejorar la solubilidad de la molécula de NS4a/NS3 purificada. El dominio de NS3 descrito en el documento US 7.491.808 B2 contiene mutaciones en Tyr1428Pro y Ser1429Ile (con referencia a la SEQ ID NO: 1) (abreviado como las mutaciones PI, introducidas para eliminar un sitio de escisión de proteasa). Estas mutaciones de PI se eliminan en el mutante NS4a/NS3.KK de este documento y se devuelven a la secuencia nativa del VHC1a, Tyr1428 y Ser1429, ya que se ha eliminado la actividad de la serina proteasa. La sustitución Pro en la posición 1428 de la SEQ ID NO: 1 puede haber tenido un efecto desestabilizador sobre la conformación de la molécula de NS4a/NS3.

La Figura 4 muestra el mapa circular del plásmido de expresión pd.4a.t.ns3.1165.KK (SEQ ID NO: 2).

Clonación

El plásmido pd.4a.t.ns3.1165.KK, que codifica NS4a-turn-NS3 con tres mutaciones (Ile1043Lys, Ile1044Lys, Ser1165Ala) se generó como sigue en un procedimiento de cuatro etapas.

En primer lugar, se ligaron juntas las siguientes piezas de ADN: (a) un vector desfosforilado Avr2-ClaI preparado a partir de pSP72.HindIII-Cla.4a.t.ns3.1165 # 14, como se describe en el documento US 7.491.808. (El inserto HindIII-ClaI de 803 pb proporciona la secuencia de la SEQ ID NO: 5: ACAAACAAA, el iniciador ATG seguido de codones para los aa 1678 a 1690 de NS4, una secuencia de giro Ser-Gly-Ser y aa 1029 a 1274 de NS3 (con referencia a la SEQ ID NO: 1). El aminoácido 1165 está mutado de Ser por Ala. PSP72 es un vector comercial de Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL Número de acceso X65332); (b) oligonucleótidos sintéticos, AB-1 y AB-2, con extremos de restricción Avr2-BglI, que codifican los aa 1040 a 1046 del VHC e introducen las mutaciones Ile1043Lys e Ile1044Lys deseadas; (c) un fragmento de ADN de BglI-ClaI de 683 pb purificado en gel a partir de pSP72.HindIII-Cla.4a.t.ns3.1165 #14; el fragmento BglI-ClaI codifica los aa 1046 a 1274 de NS3 del VHC.

AB-1

SEQ ID NO: 6: CTAGGGTGCAAGAAGACCAGCCTAAC

AB-2

SEQ ID NO: 7: AGGCTGGTCTTCTTGCACC

La mezcla de ligación se transformó en células competentes HB101 y se sembró en placas de agar Luria que contenían 100 µg/mL de ampicilina. El análisis de miniprep de clones individuales condujo a la identificación de posibles positivos que se amplificaron y secuenciaron. Un clon con la secuencia correcta se denominó pSP72.HindIII-Cla.4a.t.ns3.1165.KK #1. Posteriormente se transformó una alícuota del plásmido en la cepa SCS110 de *E. coli* para evitar la metilación de *dam* que bloquea un sitio de restricción ClaI necesario para una etapa de clonación posterior. (pT7VHC difiere de Choo y col., SEQ ID NO: 1 del VHC solo en que el residuo de aminoácido 9 es R en lugar de K y el residuo de aminoácido 11 es T en lugar de N.)

En segundo lugar, las siguientes piezas de ADN se ligaron juntas con el fin de clonar un fragmento ClaI-SalI que proporcionaría codones para los aa 1274-1657 de NS3 de la secuencia del VHC1a nativa (SEQ ID NO: 1): (a) un vector desfosforilado HindIII-SalI preparado a partir de pSP72; (b) un fragmento de restricción HindIII-ClaI de 803 pb preparado a partir de pSP72.HindIII-Cla.4a.t.ns3.1165 #14; (c) un fragmento de restricción ClaI-AvaIII de 1121 pb, que codifica los aa 1274 hasta aa 1647 de NS3, preparado a partir de pT7VHC, un constructo pUC18 que contiene todo el genoma del VHC1a (véase la SEQ ID NO: 1), como se describe en el documento US 7.449.566 B2 (véase también: Michael Vajdy y col., J of General Virology, 2006: 87, páginas 2253-2262; (d) dos oligonucleótidos AvaIII-SalI, avsal-1 y avsal-2, que completan la secuencia NS3 hasta el aa 1657 y también codifican dos codones de terminación.

avsal-1

SEQ ID NO: 8: TGTCGGCCGACCTGGAGGTCGTACGTGATAAG

avsal-2

SEQ ID NO: 9: TCGACTTATCACGTGACGACCTCCAGGTCGGCCGACATGCA

La mezcla de ligación se transformó en células competentes HB101 y se sembró en placas de agar Luria que contenían 100 µg/mL de ampicilina. El análisis de miniprep de clones individuales condujo a la identificación de posibles positivos que se amplificaron y secuenciaron. Un clon con la secuencia correcta se denominó pSP72.4a.t.ns3.1165 #2. Una alícuota del plásmido se transformó posteriormente en la cepa SCS110 de *E. coli* para evitar la metilación de *dam* que bloquea un sitio de restricción ClaI.

En tercer lugar, las siguientes piezas de ADN se ligaron juntas con el fin de clonar la secuencia codificadora completa de 4a.t.ns3.1165.KK en un vector de subclonación, ya que los intentos de clonarlo directamente en el vector de expresión de levadura no tuvieron éxito: (a) un vector desfosforilado HindIII-SalI preparado a partir de pSP72; (b) un

fragmento HindIII-ClaI de 803 pb de pSP72.HindIII-Cla.4a.t.ns3.1165.KK #1; (c) un fragmento ClaI-Sall de 1158 pb de pSP72.4a.t.ns3.1165 #2. La mezcla de ligación se transformó en células competentes HB101 y se sembró en placas de agar Luria que contenían 100 µg/mL de ampicilina. El análisis de miniprep de clones individuales condujo a la identificación de un clon positivo denominado pSP72.4a.t.ns3.1165.KK #3.

Finalmente, las siguientes piezas de ADN se ligaron juntas para crear el plásmido de expresión de levadura: (a) un vector de expresión de levadura pBS24.1 desfosforilado BamHI-Sall; (b) un fragmento BamHI-HindIII de 1366 pb para el promotor híbrido de levadura ADH2/GAPDH; (c) un fragmento HindIII-Sall de 1961 pb de pSP72.4a.t.ns3.1165.KK # 3. La mezcla de ligación se transformó en células competentes HB101. Después del análisis de miniscreen, un clon con el fragmento de restricción BamHI-Sall esperado de 3325 pb se identificó como pd.4a.t.ns3.1165.KK #7 (Figura 4).

Transformación de levadura

La cepa AD3 de *S. cerevisiae* (MATa, leu2, ura3-52, prb1-1122, pep4-3, prc1-407, gal2, [cir0], :: pDM15 (pGAP/ADR1 :: G418R), :: Yip5ΔleuAD) se transformó con pd.4a.t.ns3.1165.KK #7 usando el S.c.Easy-Comp Transformation Kit de Invitrogen, Carlsbad, CA. Los transformantes cultivados en placas de agar que carecían de uracilo (placas de ura-agar con glucosa al 8%) se sembraron en estrías para colonias individuales y se colocaron en placas de agar con Leu-glucosa al 8% para aumentar el número de copias del plásmido. Se sembraron cultivos iniciadores líquidos con Leu que contenían glucosa al 7,1% durante 24 horas a 30 °C y luego se diluyeron 1:20 en medio YEPD (extracto de levadura al 1%, peptona Bacto al 2%, glucosa al 2%). Las células se cultivaron durante 48 horas a 30 °C y a 25 °C. Para probar la expresión, se lisaron alícuotas de las células con perlas de vidrio en tampón de lisis. La proteína recombinante se expresó a niveles elevados en levadura, según se detectó mediante tinción con azul de Coomassie y se confirmó mediante análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal anti-C33C 4D-1. (El anticuerpo se describe en Sansan Lin y col., Journal of Clinical Microbiology, agosto de 2005, páginas 3917-3924).

Purificación de la proteína 4a.t.NS3.1165.KK recombinante del VHC ("TMKK" para KK mutante de giro).

La proteína TMKK (un polipéptido NS4a/NS3 modificado) se purificó como sigue: se recogieron células de *S. cerevisiae* que expresaban el mutante de giro NS4a.t.NS3.1165 KK y se suspendieron en tampón de lisis (Tris-Cl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, tabletas inhibidoras de proteasa completa Roche) y se lisaron en un Dyno-Mill (Wab Willy A. Bachofen, Basilea, Suiza) o en un aparato equivalente utilizando perlas de vidrio en una proporción de células 1:1:1: tampón: perlas de vidrio de 0,5 mm. Después de lisar durante 35 minutos, se examinó visualmente una muestra del lisado mediante microscopía para verificar que la rotura celular estaba completa al menos en un 95%. El lisado se recogió y se centrifugó a 17.700 x g durante 30 minutos a 4 °C y se añadió el sedimento que contenía la proteína insoluble al tampón de extracción (Tris-Cl 50 mM pH 8,0, NaCl 1 M, EDTA 10 mM; 2 mL/g del peso del sedimento celular inicial) y se agitó en un vaso de precipitados durante 30 min a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 30.100 x g durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante que contenía TMKK solubilizado se recogió para purificación adicional.

Se añadió sulfato de amonio sólido al sobrenadante hasta una concentración del 30% y se agitó en hielo durante tres horas. El precipitado se recogió mediante centrifugación a 30.100 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 1 x PBS (0,5 mL/g de peso inicial del sedimento), se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se diluyó 4 veces con Tampón de dilución No. 1 (Tris-Cl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, DTT 5 mM, glicerol al 10%). La suspensión diluida se agitó suavemente durante la noche a 4 °C.

Después de agitar durante la noche, la suspensión se centrifugó a 30.100 x g a 4 °C. Se recogió el sobrenadante, se diluyó dos veces con tampón de dilución No. 2 (MES 50 mM pH 6,0, DTT 5 mM, Tween-20 al 0,02%, glicerol al 10%) y se aplicó a una columna de intercambio iónico de flujo rápido SP Sepharose (GE Healthcare). Una vez completada la carga, la columna se lavó con tampón de columna SP (MES 50 mM pH 6,0, NaCl 37,5 mM, DTT 5 mM, Tween-20 al 0,02%, glicerol al 10%) y se eluyó TMKK de la columna con un gradiente creciente de NaCl hasta 0,7 M en tampón de columna. Las fracciones se agruparon basándose en la inspección visual de los geles SDS PAGE teñidos con Coomassie.

La combinación que contenía TMKK purificada con SP Sepharose se diluyó 2 veces con tampón de dilución No. 3 (Tris-Cl 50 mM, pH 8,0, DTT 5 mM, glicerol al 10%) y el pH se ajustó a 8,0. La muestra se aplicó a una columna de hidroxipatita tipo II (Bio-Rad) equilibrada en tampón de columna (Tris-Cl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, DTT 5 mM, Tween-20 al 0,02%, glicerol al 10%). Una vez completada la carga, la columna se lavó con tampón de columna que contenía NaCl 200 mM. Se recogieron fracciones de la carga y el lavado hasta que la absorbancia medida a 280 nm volvió a la línea base. La columna se depuró con un tampón de regeneración (NaPO₄ 500 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, DTT 5 mM, Tween-20 al 0,02%, glicerol al 10%). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y se combinaron las fracciones de flujo y de lavado que contenían proteína TMKK purificada. El conjunto se concentró hasta 1 a 2 mg/mL usando un concentrador de corte de 30 kD y luego se almacenó a -80 °C.

Preparación de reactivos (1)

Se preparó una solución de tampón base agregando hidrogenofosfato disódico para 1,627 g/L, dihidrogenofosfato de

potasio para 1,162 g/L, cloruro de sodio para 29,22 g/L, edetato disódico para 0,336 g/L, caseína sódica para 1,0 g/L y ProClin para 0,5 mL/L en agua purificada y ajustando el pH a aproximadamente 7,3. Se preparó un diluyente de muestra agregando TWEEN20^{MR} para 5 mL/L, solución de SDS (1%) para 20 mL/L, extracto de levadura para 0,5 g/L y solución de BSA (30%) para 10 g/L en una cantidad de la solución tampón base anterior, ajustando el pH a 6,4 y dejando que la solución resultante pase a través de un filtro de membrana de 0,22 µm.

De la misma manera, se preparó una solución tampón de marcador agregando dihidrogenofosfato de sodio para 3,28 g/L, fosfato de potasio para 13,28 g/L, cloruro de sodio para 17,56 g/L, edetato disódico para 0,372 g/L, Dextrano T2000 para 10 g/L, sacarosa 10 g/L, PVP (k = 30) para 10 g/L, ProClin para 0,5 mL/L, BSA para 20 g/L, caseína sódica para 3 g/L, suero de caballo inactivado para 20 mL/L, suero de ratón inactivado para 10 mL/L, TRITON X-100^{MR} para 10 mL/L, C14APS para 3 g/L y C16TAB para 2 g/L en agua purificada, ajustando el pH a aproximadamente 7,2 y permitiendo que la solución resultante pase a través del filtro de membrana de 0,22 µm.

Se preparó una solución tampón de sustrato disolviendo ácido cítrico anhidro para 4,936 g/L e hidrogenofosfato disódico para 6,895 g/L en agua purificada, ajustando el pH aproximadamente a 4,9 y dejando que la solución resultante pasara a través del filtro de membrana de 0,22 µm. Se preparó un reactivo de sustrato disolviendo dihidrocloruro de o-fenilendiamina de una tableta de 13 mg en solución tampón de sustrato de 6 mL.

Como reactivo de parada de la reacción, se utilizó ácido sulfúrico 4N.

Se preparó una solución tampón de limpieza agregando dihidrogenofosfato de sodio para 1,09 g/L, hidrogenofosfato de potasio para 0,31 g/L, cloruro de sodio para 8,2 g/L, Tween-20 para 1 mL/L y ProClin para 0,5 mL/L en agua purificada y permitiendo que la solución resultante pase a través del filtro de membrana de 0,22 µm.

Se preparó una solución tampón de recubrimiento para la solidificación del antígeno añadiendo dihidrogenofosfato de sodio para 5,45 g/L, hidrogenofosfato de potasio para 1,55 g y edetato disódico para 0,744 g/L en agua purificada. La solución de tampón de recubrimiento se añadió mediante antígeno recombinante TMKK del VHC o antígeno recombinante c200, cada uno para 2,0 µg/mL.

Se preparó una solución tampón de bloqueo añadiendo solución tampón de fosfato en una cantidad adecuada, caseína sódica para 10 g/L y sacarosa para 30 g/L en agua purificada.

Como marcador, se utilizó un anticuerpo monoclonal IgG antihumano de ratón (2AHIGG2) adquirido a través del Instituto de Inmunología (Tokushu Meneki Kenkyusho) que se marcó con HRP usando un "(LK11) Peroxidase Labeling Kit NH2 (Dojin Kagaku Kenkyusho)".

Ejemplo 1

Se dispensó una solución tampón de recubrimiento para la solidificación del antígeno que contiene el antígeno recombinante TMKK del VHC en una cantidad de 200 µL/pozo y se dejó estáticamente durante una noche a 4 °C. Después de eliminar el líquido del pozo, se lavó el pozo una vez con una solución tampón de fosfato. Luego, se dispensó una solución tampón de bloqueo en la cantidad de 300 µL/pozo y se dejó estáticamente durante más de cuatro horas a temperatura ambiente. Después de retirar el líquido del pozo, el pozo se lavó una vez con la solución tampón de limpieza y luego se secó para formar una placa de fase sólida.

Se dispensó un diluyente de muestra para 175 µL/pozo y cada muestra para 25 µL (suero humano comercialmente disponible de US ProMedDx) en la placa de fase sólida, respectivamente, que se agitaron con un mezclador de placas y se incubaron durante una hora a 37 °C. Después de retirar el líquido del pozo, el pozo se lavó cinco veces con la solución tampón de limpieza. A continuación, se dispensó un líquido que tenía un marcador (es decir, un anticuerpo monoclonal anti-IgG humano de ratón marcado con HRP) diluido 5.000 veces con una solución tampón diluida marcadora en la cantidad de 200 µL/pozo, que se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después de retirar el líquido del pozo, el pozo se lavó cinco veces con la solución tampón de limpieza. A continuación, se dispensó un sustrato líquido preparado añadiendo peróxido de hidrógeno (30%) en una cantidad de 0,1% en una solución tampón de sustrato en una cantidad de 200 µL/pozo y se hizo reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de dispensar una solución de parada de reacción en la cantidad de 50 µL/pozo, se midió la absorbancia mediante la medición de dos longitudes de onda de 490 nm para la longitud de onda dominante y 650 nm para longitud de onda secundaria utilizando un lector de placas (SpectraMax 340PC de Molecular Devices). El valor medido se muestra en la Tabla 2.

Ejemplo comparativo 1

Se ejecuta una fotometría en el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 excepto que se usa un líquido que contiene antígeno recombinante c200 en lugar de usar el antígeno recombinante TMKK del VHC como una solución tampón de recubrimiento para la solidificación del antígeno. El valor medido se muestra en la Tabla 2.

Ejemplo comparativo 2

Se usó RIBA3 (Ortho Diagnostic Systems) para detectar anticuerpos de las muestras anteriores de acuerdo con el manual de instrucciones. El resultado se muestra en la Tabla 2. En la tabla, el número de muestra entre paréntesis es el número de muestra asignado por ProMedDx. El "NHS" es un suero humano normal y se utilizó como control negativo.

Como se muestra en la Tabla 2, la detección o cuantificación del virus de la hepatitis C usando TMKK en el Ejemplo 1 mostró una sensibilidad más alta que usando c200 en el Ejemplo Comparativo 1. Específicamente, la detección del anticuerpo del virus de la hepatitis C se confirmó con las muestras 4 a 23 en el Ejemplo Comparativo 2. Sin embargo, la cuantificación usando c200 en el Ejemplo Comparativo 1 mostró una sensibilidad irracionalmente baja, especialmente para las muestras 4, 5 y 14, mientras que la cuantificación usando TMKK en el Ejemplo 1 mostró una alta sensibilidad de detección. Las muestras en las que no está presente el anticuerpo del virus de la hepatitis C, tales como las muestras 1 a 3, mostraron un valor de cuantificación más bajo incluso en el Ejemplo 1. No hay problema en la precisión de la detección o cuantificación. Téngase en cuenta que el resultado positivo para c33c de RIBA para la muestra 10 probablemente se debió a una reacción cruzada.

Ejemplo 2

Se ejecutó una fotometría en el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 excepto por el uso de muestras en los paneles "6212", "6215" y "9058" del panel de seroconversión (ZeptoMetrix) en el que la infección por el virus de la hepatitis C se confirma mediante cribado genético. Los valores medidos se muestran en las Tablas 3 a 5. A medida que aumenta el número de rama de las muestras (por ejemplo, "-1", "-2"), significa la fecha posterior de recolección de sangre de la muestra, es decir, significa una infección por el virus de la hepatitis C más avanzada. Los resultados conocidos de la medición de RIBA3 para cada muestra también se muestran en las Tablas 3 a 5.

Ejemplo comparativo 2

Se ejecutó una fotometría en el mismo procedimiento que en el Ejemplo Comparativo 1 excepto por el uso de muestras en los paneles "6212", "6215" y "9058" del panel de seroconversión (ZeptoMetrix). Los valores medidos se muestran en las Tablas 3 a 5.

Para las muestras en una etapa temprana de infección como en los paneles 6212-02 y 6212-03 mostrados en la Tabla 3, la detección de anticuerpos fue exitosa usando TMKK en el Ejemplo 2, pero falló usando c200 en el Ejemplo Comparativo 2 y con el RIBA3. Además, la detección de anticuerpos en los paneles 6212-04 y 6212-05 fue exitosa usando TMKK en el Ejemplo 2 y c200 en el Ejemplo Comparativo 2, sin embargo, la sensibilidad de detección fue mayor usando TMKK en el Ejemplo 2.

Como se muestra en la Tabla 4, la detección de anticuerpos en el panel 6215-04 fue exitosa usando TMKK en el Ejemplo 2, sin embargo, falló usando c200 en el Ejemplo Comparativo 2. Dado que la sensibilidad del reactivo de la presente invención fue igual a o mayor que el antígeno del núcleo (C22) conocido por tener una sensibilidad de detección relativamente alta, se confirmó que no siempre es necesario un uso combinado con un antígeno del núcleo si se usa el reactivo de la presente invención.

Como se muestra en la Tabla 5, la detección de anticuerpos en una muestra de la etapa temprana de la infección como el panel 9058-04 fue exitosa usando TMKK en el Ejemplo 2 y con el RIBA3, pero falló usando c200 en el Ejemplo Comparativo 2. La muestra es un seroconvertidor de anticuerpos del núcleo como lo indica el resultado de RIBA3, lo que sugiere la idoneidad del uso combinado con el antígeno del núcleo (C22) conocido por tener una sensibilidad de detección relativamente alta. Además, la detección de anticuerpos en los paneles 9058-05 tuvo éxito usando TMKK en el Ejemplo 2 y usando c200 en el Ejemplo Comparativo 2. Sin embargo, la sensibilidad fue mayor usando TMKK en el Ejemplo 2.

Preparación de reactivos (2)

Los reactivos preparados en la "Preparación de reactivos (1)" mencionada anteriormente se utilizan excepto para los reactivos descritos a continuación.

Se preparó un diluyente de muestra añadiendo TWEEN20^{MR} para 5 mL/L, solución SDS (1%) para 20 mL/L, extracto de levadura para 0,5 g/L, solución BSA (30%) para 10 g/L, LDAO para 5 g/L y DTT 1 mM en la cantidad adecuada de solución tampón base descrita anteriormente, ajustando el pH a 7,3 y dejando que la solución resultante pase a través de un filtro de membrana de 0,22 µm.

Se preparó una solución tampón de recubrimiento para la solidificación del anticuerpo agregando cloruro de sodio para 5,85 g/L, anhídrido acético sódico para 5,18 g/L, ácido acético para 2,2 mL/L y sulfatos de amonio para 114 g/L en agua purificada y ajustando el pH aproximadamente a 4,8. La solución de recubrimiento se añadió mediante anticuerpo monoclonal c11-3 y anticuerpo monoclonal c11-7 a razón de 1,8 µg/mL respectivamente.

Como marcador, se usó un anticuerpo marcado incluido en "VHC core Ag ELISA Kit (Ortho Diagnostic Systems) para

la detección de antígeno, mientras que se uso un antígeno recombinante TMKK del VHC que se marcó con HRP usando "(LK11) Peroxidase Labeling Kit NH2" (Dojin Kagaku Kenkyusho) para la detección de anticuerpos.

Ejemplo 3

La solución tampón de recubrimiento anterior para la solidificación del anticuerpo se dispensó en una cantidad de 200 μ L/pozo en una microplaca de 96 pozos (tipo Corning de alta unión) y se dejó estáticamente durante seis horas a temperatura ambiente. Después de retirar el líquido del pozo, el pozo se lavó tres veces con una solución tampón de fosfato. A continuación, se dispensó la solución tampón de recubrimiento anterior para la solidificación del antígeno en una cantidad de 200 μ L/pozo y se dejó durante una noche a 4 °C. Después de retirar el líquido del pozo, se lavó el pozo una vez con la solución tampón de fosfato. Luego, se dispensó una solución tampón de bloqueo en la cantidad de 300 μ L/pozo y se dejó estáticamente durante más de cuatro horas a temperatura ambiente. Después de retirar el líquido del pozo, el pozo se lavó una vez con la solución tampón de limpieza y luego se secó para formar una placa de fase sólida.

Se dispensó un diluyente de muestra en la cantidad de 150 μ L/pozo, y "6212" y "6224" del panel de seroconversión (ZeproMetrix) como muestra en la cantidad de 50 μ L en la placa de fase sólida, respectivamente, que se agitaron mediante un mezclador de placas, y se incubó durante una hora a 37 °C. Después de retirar el líquido del pozo, el pozo se lavó cinco veces con la solución tampón de limpieza. A continuación, un líquido en el que un marcador (es decir, un antígeno recombinante TMKK del VHC marcado con HRP) diluido 40.000 veces con una solución tampón de dilución del marcador, y un líquido en el que un marcador (es decir, un anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado con HRP) diluido 100 veces por una solución tampón diluida de marcador, se dispensaron en una cantidad de 200 μ L/pozo, que se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después de retirar el líquido del pozo, el pozo se lavó cinco veces con la solución tampón de limpieza. Luego, se dispensó un sustrato líquido preparado mediante la adición de peróxido de hidrógeno (30%) en una cantidad de 0,1% en una solución tampón de sustrato en una cantidad de 200 μ L/pozo y se hizo reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de dispensar una solución de parada de reacción en la cantidad de 50 μ L/pozo, se realizó una fotometría midiendo la absorbancia a través de la medición de dos longitudes de onda de 490 nm para la longitud de onda dominante y 650 nm para la longitud de onda secundaria utilizando un lector de placas (SpectraMax 340PC de Molecular Devices). Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7. Los resultados conocidos de la medición de RIBA3 para cada muestra también se muestran en las Tablas 6 y 7. El COI en la tabla es un valor calculado midiendo 10 unidades de muestras negativas de anticuerpos contra el VHC aplicando un valor de corte en el que el valor promedio de DO se añade en 10SD.

Como en el Ejemplo comparativo 3, se ejecuto una fotometría en el mismo procedimiento que en el Ejemplo 3 excepto por: usando "Monolisa VHC Ag-Ab (Bio-Rad)", un kit de detección antígeno-anticuerpo del VHC disponible comercialmente en lugar del reactivo de cuantificación de la presente invención; realizar una prueba de acuerdo con el manual de instrucciones del kit; y determinar la DO y el COI. Como en el Ejemplo comparativo 4, el COI conocido de "HCV Ag/Ab Combo (ABBOTT) para cada muestra se muestra en las Tablas 6 y 7. Además, como en el Ejemplo comparativo 5, los resultados de la medición de la cantidad de anticuerpos en cada muestra usando "antígeno del VHC LUMIPULSE^{MR} Ortho (Ortho Diagnostic Systems) de acuerdo con el manual de instrucciones se muestra en las Tablas 6 y 7. Los resultados conocidos de la medición de RIBA3 para cada muestra también se muestran en las Tablas 6 y 7.

Como se muestra en la Tabla 6, para muestras en una etapa temprana de infección, tales como los paneles 6212-01 y 6212-02, la detección del VHC fue exitosa usando Ab anti-núcleo del VHC y TMKK en el Ejemplo 3, falló en el Ejemplo Comparativo 4, y tuvo éxito pero con baja sensibilidad en el Ejemplo comparativo 4 en comparación con el Ejemplo comparativo 3. Además, como se muestra en los paneles 6212-05 y 6212-06, la detección del VHC en muestras en la etapa de disminución de la cantidad de antígeno falló en el Ejemplo comparativo 5, sin embargo, la detección del VHC fue posible usando Ab anti-núcleo del VHC y TMKK en el Ejemplo 3.

Como se muestra en la Tabla 7, para muestras en una etapa temprana de infección, tal como los paneles 6224-01 a 6224-03, la detección del VHC fue exitosa usando Ab anti-núcleo del VHC y TMKK en el Ejemplo 3 con mayor sensibilidad que en el Ejemplo Comparativo 3. Además, como se muestra en el panel 6224-04, la detección del VHC en muestras en la etapa de disminución de la cantidad de antígeno falló en el Ejemplo Comparativo 4, sin embargo, tuvo éxito usando Ab anti-núcleo del VHC y TMKK en el Ejemplo 3.

Aunque se han mostrado realizaciones particulares de la invención, se entenderá, por supuesto, que la invención no se limita a las mismas, ya que los expertos en la técnica pueden realizar modificaciones, particularmente a la luz de las enseñanzas anteriores.

Tabla 1

Dominio	Límites aproximados *
C (núcleo)	1-191 de la SEQ ID NO:1
E1	192-383 de la SEQ ID NO:1
E2	384-746 de la SEQ ID NO:1

(continuación)

Dominio	Límites aproximados *
P7	747-809 de la SEQ ID NO:1
NS2	810-1026 de la SEQ ID NO:1
NS3	1027-1657 de la SEQ ID NO:1
NS4a	1658-1711 de la SEQ ID NO:1
NS4b	1712-1972 de la SEQ ID NO:1
NS5a	1973-2420 de la SEQ ID NO:1
NS5b	2421-3011 de la SEQ ID NO:1

* Numerado en relación con el VHC-1. Véase, Choo y col., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2451-2455.

Tabla 2. TMKK c200

Número de muestra	Ejemplo Comparativo 2 (RIBA3)					Ejemplo 1	Ejemplo Comparativo 1
	c100p	c33c	c22p	NS5	SOD		
1(NHS)						0,017	0,020
2(007)	-	-	-	±	-	0,015	0,017
3(011)	-	±	-	-	-	0,066	0,019
4(053)	-	-	2+	-	-	0,785	0,060
5(077)	±	±	3+	-	-	0,760	0,020
6(057)	±	±	3+	-	-	2,049	0,175
7(037)	±	±	4+	-	-	2,220	0,357
8(059)	1+	±	4+	-	-	3,254	3,090
9(034)	-	±	4+	3+	-	3,200	0,515
10(006)	-	3+	-	±	-	0,042	0,145
11(093)	2+	1+	±	-	-	2,007	0,324
12(026)	±	1+	±	1+	-	1,785	0,129
13(048)	-	1+	1+	-	-	2,495	0,295
14(064)	±	1+	4+	1+	-	1,574	0,093
15(088)	-	3+	1+	-	-	2,183	0,830
16(004)	1+	3+	4+	-	-	3,953	3,156
17(076)	±	4+	-	-	-	0,961	0,495
18(012)	-	4+	-	4+	-	3,562	3,569
19(025)	±	4+	-	4+	-	2,640	2,586
20(033)	2+	4+	-	4+	-	3,332	1,939
21(031)	4+	4+	±	±	-	3,048	2,586
22(094)	4+	4+	4+	-	-	3,954	3,956
23(002)	4+	4+	4+	4+	-	3,550	3,356

5

Tabla 3. TMKK c200

Número de panel	Día de recolección de sangre	Ejemplo 2	Ejemplo comparativo 2	RIBA3.0				
		DO	DO	C100	C33	C22	NS5	SOD
6212-01	11/16/95	0,004	0,006	-	-	-	-	-
6212-02	11/28/95	0,237	0,026	-	+/-	-	-	-
6212-03	11/30/95	0,270	0,034	-	+/-	-	-	-
6212-04	12/09/95	0,416	0,238	-	1+	-	-	-
6212-05	12/12/95	0,828	0,476	-	1+	-	-	-
6212-06	12/18/95	1,111	0,688	-	1+	-	-	-
6212-07	12/23/95	1,158	1,081	-	1+	-	-	-
6212-08	01/08/96	3,615	3,946	-	4+	-	-	-
6212-09	01/10/96	3,946	3,936	-	4+	-	-	-

Tabla 4. TMKK c200

Número de panel	Día de recolección de sangre	Ejemplo 2	Comparativo 2	RIBA3.0				
		DO	DO	C100	C33	C22	NS5	SOD
6215-01	01/19/96	0,006	0,015	-	-	-	-	-

(continuación)

Número de panel	Día de recolección de sangre	Ejemplo 2	Ejemplo comparativo 2	RIBA3.0				
		DO	DO	C100	C33	C22	NS5	SOD
6215-02	01/22/96	0,007	0,014	-	-	-	-	-
6215-03	01/29/96	0,008	0,016	-	-	-	-	-
6215-04	02/08/96	0,131	0,038	-	+/-	4+	-	-

Tabla 5. TMKK c200

Número de panel	Día de recolección de sangre	Ejemplo 2	Ejemplo Comparativo 2	RIBA3.0				
		DO	DO	C100	C33	C22	NS5	SOD
9058-01	3/06/98	0,026	0,014	-	-	+/-	-	-
9058-02	3/09/98	0,029	0,013	-	-	+/-	-	-
9058-03	3/13/98	0,058	0,015	-	+/-	+	-	-
9058-04	3/16/98	0,142	0,027	-	1+	1+	-	-
9058-05	3/20/98	0,228	0,081	-	1+	2+	-	-

Tabla 6 combo: Ab del núcleo anti-VHC + TMKK

	Ejemplo 3		Ejemplo Comparativo 3 Bio-Rad Monolisa VHC Ag-Ab		Ejemplo Comparativo 4 ABBOTT HCV Ag/Ab Combo	Ejemplo Comparativo 5 Lumi HCV Ag	RIBA 3.0				
	DO	COI	DO	COI	COI	fmol/L	c100p	c33c	c22p	NS5	SOD
6212-01	0,127	2,3	0,107	0,38	0,81	2198,5	-	-	-	-	-
6212-02	0,704	12,9	0,218	0,78	0,53	166,5	-	+/-	-	-	-
6212-03	0,849	15,5	0,290	1,03	0,61	108,5	-	+/-	-	-	-
6212-04	1,687	30,8	1,065	3,79	0,66	129,5	-	1+	-	-	-
6212-05	1,591	29,1	1,360	4,85	0,63	0,5	-	1+	-	-	-
6212-06	1,616	29,5	1,478	5,27	0,59	27,5	-	1+	-	-	-
6212-07	1,453	26,6	1,490	5,31	0,64	271,0	-	1+	-	-	-
6212-08	2,207	40,3	2,096	7,47	2,25	276,0	-	4+	-	-	-
6212-09	1,98	36,2	2,140	7,63	2,44	401,0	-	4+	-	-	-

Tabla 7 combo: Ab del núcleo anti-VHC + TMKK

	Ejemplo 3		Ejemplo Comparativo 3 Bio-Rad Monolisa VHC Ag-Ab		Ejemplo Comparativo 4 ABBOTT HCV Ag/Ab Combo	Ejemplo Comparativo 5 Lumi HCV Ag	RIBA 3.0				
	DO	COI	DO	COI			c100p	c33c	c22p	NS5	SOD
6224-01	0,209	2,4	0,077	0,27	1,565	1951,6	-	-	-	-	-
6224-02	0,140	1,6	0,091	0,32	1,732	2361,2	-	-	-	-	-
6224-03	0,287	3,3	0,097	0,34	1,388	2184,0	-	-	-	-	-
6224-04	0,153	1,7	0,072	0,26	0,866	943,8	-	+/-	-	-	-
6224-05	0,469	5,3	0,536	1,90	4,137	2175,4	-	1	-	-	-
6224-06	0,558	6,4	0,818	2,91	4,599	1959,2	-	2	-	-	-

Listado de secuencias

5	<110> Grifols Worldwide Operations Limited Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. Ortho Clinical Diagnostics, K.K.															
	<120> Polipéptidos NS4A/NS3 Modificado del VHC y Usos de los Mismos															
	<130> CDS5174WOPCT															
10	<150> US 62/139,183															
	<151> 2015-03-27															
15	<160> 9															
	<170> PatentIn versión 3.5															
20	<210> 1															
	<211> 1860															
	<212> PRT															
	<213> Virus de la hepatitis C															
25	<400> 1															
	Met	Ser	Thr	Asn	Pro	Lys	Pro	Gln	Lys	Lys	Asn	Lys	Arg	Asn	Thr	Asn
	1				5					10					15	
	Arg	Arg	Pro	Gln	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Val	Gly
				20					25					30		
	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Leu	Gly	Val	Arg	Ala
			35					40					45			
	Thr	Arg	Lys	Thr	Ser	Glu	Arg	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Arg	Arg	Gln	Pro
	50						55					60				
	Ile	Pro	Lys	Ala	Arg	Arg	Pro	Glu	Gly	Arg	Thr	Trp	Ala	Gln	Pro	Gly
	65					70					75					80
	Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	Tyr	Gly	Asn	Glu	Gly	Cys	Gly	Trp	Ala	Gly	Trp
					85					90					95	
	Leu	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Pro	Ser	Trp	Gly	Pro	Thr	Asp	Pro
				100					105					110		
	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Asp	Thr	Leu	Thr	Cys
				115				120					125			
	Gly	Phe	Ala	Asp	Leu	Met	Gly	Tyr	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Ala	Pro	Leu
		130					135					140				
	Gly	Gly	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	His	Gly	Val	Arg	Val	Leu	Glu	Asp
	145					150					155					160

ES 2 832 335 T3

Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
 165 170 175
 Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr
 180 185 190
 Gln Val Arg Asn Ser Thr Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro
 195 200 205
 Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile Leu His Thr Pro
 210 215 220
 Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Arg Cys Trp Val
 225 230 235 240
 Ala Met Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Ala Thr
 245 250 255
 Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu Cys
 260 265 270
 Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Gly
 275 280 285
 Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Gly Cys
 290 295 300
 Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
 305 310 315 320
 Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Met Ala Gln
 325 330 335
 Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala His
 340 345 350
 Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn Trp
 355 360 365
 Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Ala Glu
 370 375 380
 Thr His Val Thr Gly Gly Ser Ala Gly His Thr Val Ser Gly Phe Val
 385 390 395 400
 Ser Leu Leu Ala Pro Gly Ala Lys Gln Asn Val Gln Leu Ile Asn Thr
 405 410 415

ES 2 832 335 T3

Asn Gly Ser Trp His Leu Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser
 420 425 430
 Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr His His Lys Phe Asn
 435 440 445
 Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Pro Leu Thr Asp
 450 455 460
 Phe Asp Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Pro
 465 470 475 480
 Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Lys Pro Cys Gly Ile
 485 490 495
 Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
 500 505 510
 Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser
 515 520 525
 Trp Gly Glu Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro
 530 535 540
 Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
 545 550 555 560
 Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Ala Gly Asn
 565 570 575
 Asn Thr Leu His Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Asp Ala
 580 585 590
 Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Leu
 595 600 605
 Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr
 610 615 620
 Thr Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
 625 630 635 640
 Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp
 645 650 655
 Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Thr Thr Thr Gln Trp

ES 2 832 335 T3

660						665						670					
Gln	Val	Leu	Pro	Cys	Ser	Phe	Thr	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Thr	Gly		
		675							680						685		
Leu	Ile	His	Leu	His	Gln	Asn	Ile	Val	Asp	Val	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Gly		
	690					695					700						
Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Ala	Ser	Trp	Ala	Ile	Lys	Trp	Glu	Tyr	Val	Val		
705					710					715					720		
Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Asp	Ala	Arg	Val	Cys	Ser	Cys	Leu	Trp		
				725					730					735			
Met	Met	Leu	Leu	Ile	Ser	Gln	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu	Glu	Asn	Leu	Val		
			740						745				750				
Ile	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Gly	Thr	His	Gly	Leu	Val	Ser	Phe		
		755						760					765				
Leu	Val	Phe	Phe	Cys	Phe	Ala	Trp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Trp	Val	Pro		
	770					775					780						
Gly	Ala	Val	Tyr	Thr	Phe	Tyr	Gly	Met	Trp	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu		
785					790					795					800		
Leu	Ala	Leu	Pro	Gln	Arg	Ala	Tyr	Ala	Leu	Asp	Thr	Glu	Val	Ala	Ala		
				805					810					815			
Ser	Cys	Gly	Gly	Val	Val	Leu	Val	Gly	Leu	Met	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser		
			820					825					830				
Pro	Tyr	Tyr	Lys	Arg	Tyr	Ile	Ser	Trp	Cys	Leu	Trp	Trp	Leu	Gln	Tyr		
		835					840					845					
Phe	Leu	Thr	Arg	Val	Glu	Ala	Gln	Leu	His	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Leu		
	850					855					860						
Asn	Val	Arg	Gly	Gly	Arg	Asp	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Met	Cys	Ala	Val		
865					870					875					880		
His	Pro	Thr	Leu	Val	Phe	Asp	Ile	Thr	Lys	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Phe		
				885					890					895			
Gly	Pro	Leu	Trp	Ile	Leu	Gln	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Val	Pro	Tyr	Phe		
			900					905					910				

ES 2 832 335 T3

Val	Arg	Val	Gln	Gly	Leu	Leu	Arg	Phe	Cys	Ala	Leu	Ala	Arg	Lys	Met			
		915					920					925						
Ile	Gly	Gly	His	Tyr	Val	Gln	Met	Val	Ile	Ile	Lys	Leu	Gly	Ala	Leu			
	930					935					940							
Thr	Gly	Thr	Tyr	Val	Tyr	Asn	His	Leu	Thr	Pro	Leu	Arg	Asp	Trp	Ala			
945					950					955					960			
His	Asn	Gly	Leu	Arg	Asp	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Glu	Pro	Val	Val	Phe			
				965					970						975			
Ser	Gln	Met	Glu	Thr	Lys	Leu	Ile	Thr	Trp	Gly	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala			
			980					985					990					
Cys	Gly	Asp	Ile	Ile	Asn	Gly	Leu	Pro	Val	Ser	Ala	Arg	Arg	Gly	Arg			
		995					1000					1005						
Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Pro	Ala	Asp	Gly	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Trp				
	1010					1015					1020							
Arg	Leu	Leu	Ala	Pro	Ile	Thr	Ala	Tyr	Ala	Gln	Gln	Thr	Arg	Gly				
	1025					1030					1035							
Leu	Leu	Gly	Cys	Ile	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Gly	Arg	Asp	Lys	Asn				
	1040					1045					1050							
Gln	Val	Glu	Gly	Glu	Val	Gln	Ile	Val	Ser	Thr	Ala	Ala	Gln	Thr				
	1055					1060					1065							
Phe	Leu	Ala	Thr	Cys	Ile	Asn	Gly	Val	Cys	Trp	Thr	Val	Tyr	His				
	1070					1075					1080							
Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Thr	Ile	Ala	Ser	Pro	Lys	Gly	Pro	Val	Ile				
	1085					1090					1095							
Gln	Met	Tyr	Thr	Asn	Val	Asp	Gln	Asp	Leu	Val	Gly	Trp	Pro	Ala				
	1100					1105					1110							
Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Ser	Leu	Thr	Pro	Cys	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser				
	1115					1120					1125							
Asp	Leu	Tyr	Leu	Val	Thr	Arg	His	Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Val	Arg				
	1130					1135					1140							
Arg	Arg	Gly	Asp	Ser	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Arg	Pro	Ile				
	1145					1150					1155							

ES 2 832 335 T3

Ser	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Leu	Cys	Pro	Ala
1160						1165					1170			
Gly	His	Ala	Val	Gly	Ile	Phe	Arg	Ala	Ala	Val	Cys	Thr	Arg	Gly
1175						1180					1185			
Val	Ala	Lys	Ala	Val	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Asn	Leu	Glu	Thr
1190						1195					1200			
Thr	Met	Arg	Ser	Pro	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro	Val
1205						1210					1215			
Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Gln	Val	Ala	His	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Gly
1220						1225					1230			
Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Lys	Val	Pro	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Gln	Gly
1235						1240					1245			
Tyr	Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly
1250						1255					1260			
Phe	Gly	Ala	Tyr	Met	Ser	Lys	Ala	His	Gly	Ile	Asp	Pro	Asn	Ile
1265						1270					1275			
Arg	Thr	Gly	Val	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Gly	Ser	Pro	Ile	Thr	Tyr
1280						1285					1290			
Ser	Thr	Tyr	Gly	Lys	Phe	Leu	Ala	Asp	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Gly
1295						1300					1305			
Ala	Tyr	Asp	Ile	Ile	Ile	Cys	Asp	Glu	Cys	His	Ser	Thr	Asp	Ala
1310						1315					1320			
Thr	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr
1325						1330					1335			
Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Val	Val	Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly
1340						1345					1350			
Ser	Val	Thr	Val	Pro	His	Pro	Asn	Ile	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Ser
1355						1360					1365			
Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ile	Pro	Leu	Glu
1370						1375					1380			
Val	Ile	Lys	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe	Cys	His	Ser	Lys	Lys
1385						1390					1395			

ES 2 832 335 T3

Lys Cys	Asp Glu Leu	Ala Ala	Lys Leu Val	Ala Leu	Gly Ile Asn
1400		1405		1410	
Ala Val	Ala Tyr Tyr Arg	Gly	Leu Asp Val Ser	Val	Ile Pro Thr
1415		1420		1425	
Ser Gly	Asp Val Val Val	Val	Ala Thr Asp Ala	Leu	Met Thr Gly
1430		1435		1440	
Tyr Thr	Gly Asp Phe Asp	Ser	Val Ile Asp Cys	Asn	Thr Cys Val
1445		1450		1455	
Thr Gln	Thr Val Asp Phe	Ser	Leu Asp Pro Thr	Phe	Thr Ile Glu
1460		1465		1470	
Thr Ile	Thr Leu Pro Gln	Asp	Ala Val Ser Arg	Thr	Gln Arg Arg
1475		1480		1485	
Gly Arg	Thr Gly Arg Gly	Lys	Pro Gly Ile Tyr	Arg	Phe Val Ala
1490		1495		1500	
Pro Gly	Glu Arg Pro Ser	Gly	Met Phe Asp Ser	Ser	Val Leu Cys
1505		1510		1515	
Glu Cys	Tyr Asp Ala Gly	Cys	Ala Trp Tyr Glu	Leu	Thr Pro Ala
1520		1525		1530	
Glu Thr	Thr Val Arg Leu	Arg	Ala Tyr Met Asn	Thr	Pro Gly Leu
1535		1540		1545	
Pro Val	Cys Gln Asp His	Leu	Glu Phe Trp Glu	Gly	Val Phe Thr
1550		1555		1560	
Gly Leu	Thr His Ile Asp	Ala	His Phe Leu Ser	Gln	Thr Lys Gln
1565		1570		1575	
Ser Gly	Glu Asn Leu Pro	Tyr	Leu Val Ala Tyr	Gln	Ala Thr Val
1580		1585		1590	
Cys Ala	Arg Ala Gln Ala	Pro	Pro Pro Ser Trp	Asp	Gln Met Trp
1595		1600		1605	
Lys Cys	Leu Ile Arg Leu	Lys	Pro Thr Leu His	Gly	Pro Thr Pro
1610		1615		1620	
Leu Leu	Tyr Arg Leu Gly	Ala	Val Gln Asn Glu	Ile	Thr Leu Thr

ES 2 832 335 T3

1625		1630		1635
His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu				
1640		1645		1650
Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala				
1655		1660		1665
Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile Val				
1670		1675		1680
Gly Arg Val Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg				
1685		1690		1695
Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ser Gln				
1700		1705		1710
His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu Gln Phe				
1715		1720		1725
Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Ser Arg Gln Ala				
1730		1735		1740
Glu Val Ile Ala Pro Ala Val Gln Thr Asn Trp Gln Lys Leu Glu				
1745		1750		1755
Thr Phe Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln				
1760		1765		1770
Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala				
1775		1780		1785
Ser Leu Met Ala Phe Thr Ala Ala Val Thr Ser Pro Leu Thr Thr				
1790		1795		1800
Ser Gln Thr Leu Leu Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala				
1805		1810		1815
Gln Leu Ala Ala Pro Gly Ala Ala Thr Ala Phe Val Gly Ala Gly				
1820		1825		1830
Leu Ala Gly Ala Ala Ile Gly Ser Val Gly Leu Gly Lys Val Leu				
1835		1840		1845
Ile Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val Ala				
1850		1855		1860

ES 2 832 335 T3

<210> 2
 <211> 646
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

5

<400> 2

```

Met Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Val Val Leu Ser Gly Ser Gly
1          5          10          15

Ser Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Lys
20          25          30

Lys Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val
35          40          45

Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys Ile Asn
50          55          60

Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr Ile Ala
65          70          75          80

Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp
85          90          95

Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr Pro Cys
100         105         110

Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val
115         120         125

Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro
130         135         140

Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ala Gly Gly Pro Leu Leu Cys
145         150         155         160

Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg
165         170         175

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

Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val Val
195         200         205

Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly
210         215         220
  
```

ES 2 832 335 T3

Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val
 225 230 235 240
 Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr
 245 250 255
 Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg
 260 265 270
 Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe
 275 280 285
 Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys
 290 295 300
 Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr
 305 310 315 320
 Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala
 325 330 335
 Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu
 340 345 350
 Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala
 355 360 365
 Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His
 370 375 380
 Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly
 385 390 395 400
 Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro
 405 410 415
 Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly
 420 425 430
 Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr
 435 440 445
 Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Ile
 450 455 460
 Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg Thr
 465 470 475 480

ES 2 832 335 T3

Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg
485 490 495

Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala
500 505 510

Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu
515 520 525

Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu
530 535 540

Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His
545 550 555 560

Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr Leu Val
565 570 575

Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser
580 585 590

Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His
595 600 605

Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Ile
610 615 620

Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala
625 630 635 640

Asp Leu Glu Val Val Thr
645

<210> 3
<211> 13
5 <212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 3

10 Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Val Val Leu Ser Gly
1 5 10

<210> 4
<211> 629
<212> PRT
15 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 4

ES 2 832 335 T3

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

ES 2 832 335 T3

Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu
260 265 270

Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp
275 280 285

Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val
290 295 300

Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr
305 310 315 320

Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu
325 330 335

Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile
340 345 350

Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser
355 360 365

Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile
370 375 380

Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr
385 390 395 400

Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Tyr
405 410 415

Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln
420 425 430

Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Ile Thr
435 440 445

Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly
450 455 460

Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro
465 470 475 480

Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly
485 490 495

Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg
500 505 510

ES 2 832 335 T3

Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu
515 520 525

Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe
530 535 540

Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr Leu Val Ala
545 550 555 560

Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp
565 570 575

Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly
580 585 590

Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Ile Thr
595 600 605

Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp
610 615 620

Leu Glu Val Val Thr
625

<210> 5
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5
acaaaacaaa 10

<210> 6
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6
ctagggtgca agaagaccag cctaac 26

<210> 7
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 7
aggctggtct tctgcacc 19

<210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
 10 tgcggccga cctggaggtc gtcacgtgat aag 33
 <210> 9
 <211> 41
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 9
 tcgacttatc acgtgacgac ctccaggtcg gccgacatgc a 41

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo de inmunoensayo que comprende un polipéptido, comprendiendo el polipéptido:

5 un dominio de NS4a del virus de la hepatitis C que comprende la SEQ ID NO: 3;
un dominio de NS3 modificado del virus de la hepatitis C que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4
que comprende sustituciones de uno o más residuos de aminoácidos 55, 79 y 137, de modo que la actividad proteasa
del dominio de NS3 modificado del virus de la hepatitis C se inhibe con respecto a la actividad proteasa de un dominio
10 de NS3 del virus de la hepatitis C que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 que carece de
sustituciones; y
una región intermedia que conecta el terminal carboxilo del dominio de NS4a con el terminal amino del dominio de
NS3 modificado.

15 2. El reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que la modificación comprende una sustitución de alanina
o glicina y, opcionalmente, en el que la modificación comprende una sustitución de alanina por el residuo de
aminoácido 137.

20 3. El reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que la región intermedia del polipéptido tiene la secuencia
de aminoácidos SGS.

4. El reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos
que se muestra en la SEQ ID NO: 2.

25 5. El reactivo de inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 unido a un soporte sólido.

6. Un método para detectar anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en una muestra biológica, comprendiendo
dicho método:

30 (a) proporcionar el reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que opcionalmente el reactivo de
inmunoensayo está unido a un soporte sólido;
(b) combinar una muestra biológica con dicho reactivo de inmunoensayo en condiciones que permitan que los
anticuerpos del VHC, cuando estén presentes en la muestra biológica, se unan a dicho polipéptido para formar un
primer complejo inmune;
35 (c) añadir al primer complejo inmune de la etapa (b) un detector marcado, en el que dicho detector marcado es reactivo
con dicho primer complejo inmunitario;
(d) detectar segundos complejos inmunes formados entre el detector marcado y el primer complejo inmune, si lo
hubiera, como indicación de la presencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en la muestra biológica,
opcionalmente en el que el detector marcado es un anticuerpo marcado o un antígeno marcado.

40 7. Un método para detectar anticuerpos contra el virus de la hepatitis C y/o el antígeno del virus de la hepatitis C en
una muestra biológica, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar el reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1;
(b) combinar una muestra biológica con dicho reactivo de inmunoensayo y uno o más anticuerpos anti-VHC en
45 condiciones que permitan que los anticuerpos del VHC, cuando estén presentes en la muestra biológica, se unan a
dicho polipéptido para formar un primer complejo inmune, y que además permitan que los antígenos del VHC, cuando
están presentes en la muestra biológica, se unan a dichos anticuerpos anti-VHC para formar un segundo complejo
inmune;
(c) añadir al primer complejo inmune de la etapa (b) un primer detector marcado, en el que dicho primer detector
50 marcado es reactivo con dicho primer complejo inmune, y añadir al segundo complejo inmune de la etapa (b) un
segundo detector marcado, en el que dicho segundo detector marcado es reactivo con el segundo complejo inmune;
y
(d) detectar los terceros complejos inmunes formados entre el primer detector marcado y el primer complejo inmune,
si los hay, y detectar los cuartos complejos inmunes formados entre el segundo detector marcado y el segundo
55 complejo inmune, si los hay, como indicación de la presencia de anticuerpos al VHC y/o al antígeno del VHC en la
muestra biológica, opcionalmente en la que el primer detector marcado y el segundo detector marcado son cada uno
un anticuerpo marcado o antígeno marcado y, opcionalmente, uno o más del reactivo de inmunoensayo y uno o más
anticuerpos anti-VHC están unidos al mismo o diferente soporte sólido.

60 8. Un kit de prueba de inmunodiagnóstico que comprende el reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1 e
instrucciones para realizar la prueba de inmunodiagnóstico.

9. El kit de prueba de inmunodiagnóstico de la reivindicación 8, que comprende además uno o más anticuerpos anti-
VHC, en el que opcionalmente el uno o más anticuerpos anti-VHC comprenden un anticuerpo anti-núcleo del VHC.

65 10. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

11. Un método para seleccionar muestras biológicas de un suministro de muestras biológicas humanas que comprende seleccionar de dicho suministro aquellas muestras que comprenden anticuerpos que forman un complejo antígeno-anticuerpo con el reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que opcionalmente las muestras biológicas son sangre.
- 5 12. El método de la reivindicación 11, en el que la selección es para identificar una muestra positiva para VHC para retirarla del suministro, que comprende opcionalmente además emplear muestras biológicas que no se seleccionan para la preparación de productos relacionados con la sangre.
- 10 13. Un método para seleccionar muestras biológicas de un suministro de muestras biológicas humanas que comprende seleccionar de dicho suministro aquellas muestras que no comprenden anticuerpos que forman un complejo antígeno-anticuerpo con el reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que opcionalmente la selección es para identificar muestras biológicas útiles para la preparación de productos relacionados con la sangre.
- 15 14. El reactivo de inmunoensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para uso en diagnóstico.
15. El reactivo de inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para uso en el diagnóstico de infección por VHC.

FIG. 1

HCV1									
C	E1	E2	P7	NS2	NS3	NS4a	NS4b	NS5a	NS5b
1-191	192-383	384-746		810-1026	1027-1657		1712-1972	1973-2420	2421-3011

*con referencia a la SEQ ID NO: 1

FIG. 2

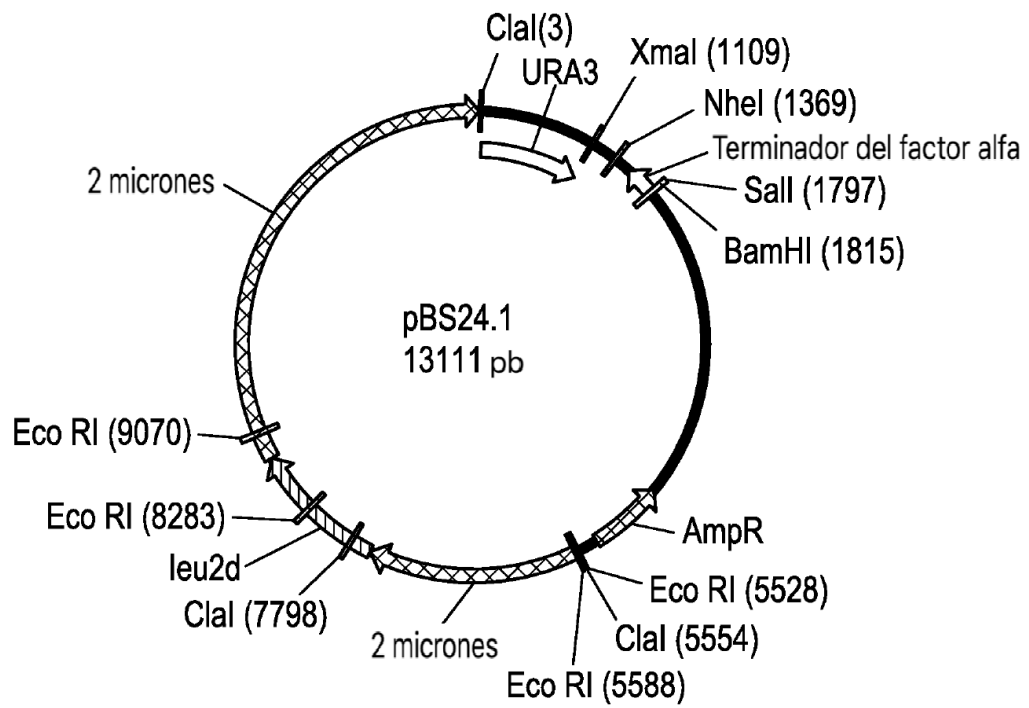
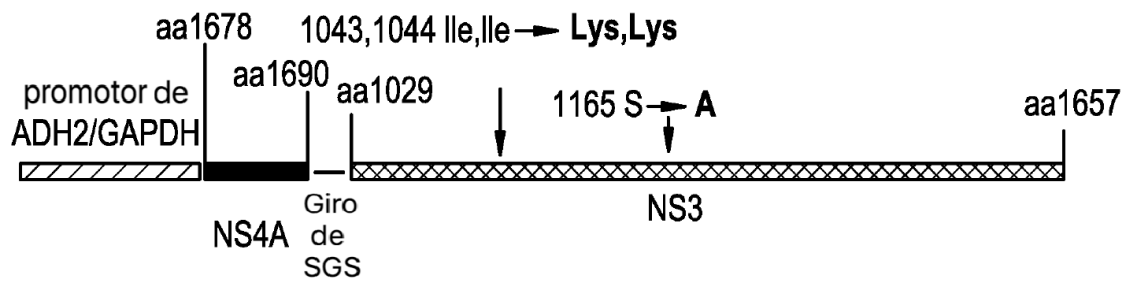


FIG. 3



*con referencia a la SEQ ID NO: 1

FIG. 4

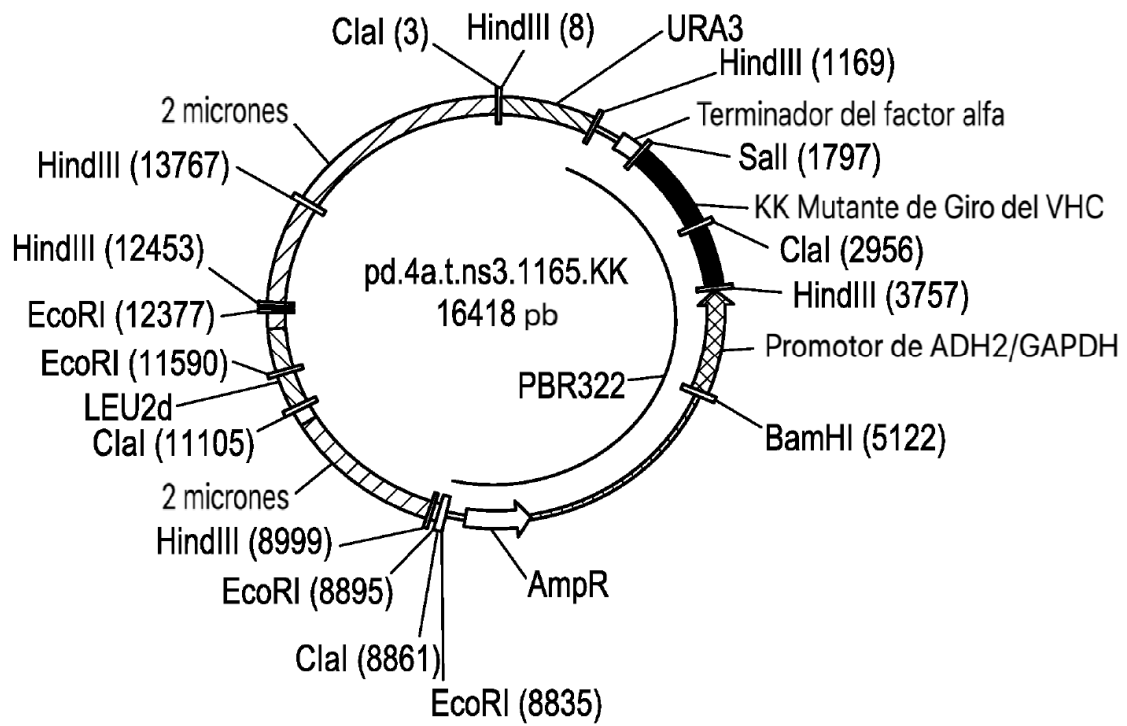


FIG. 5

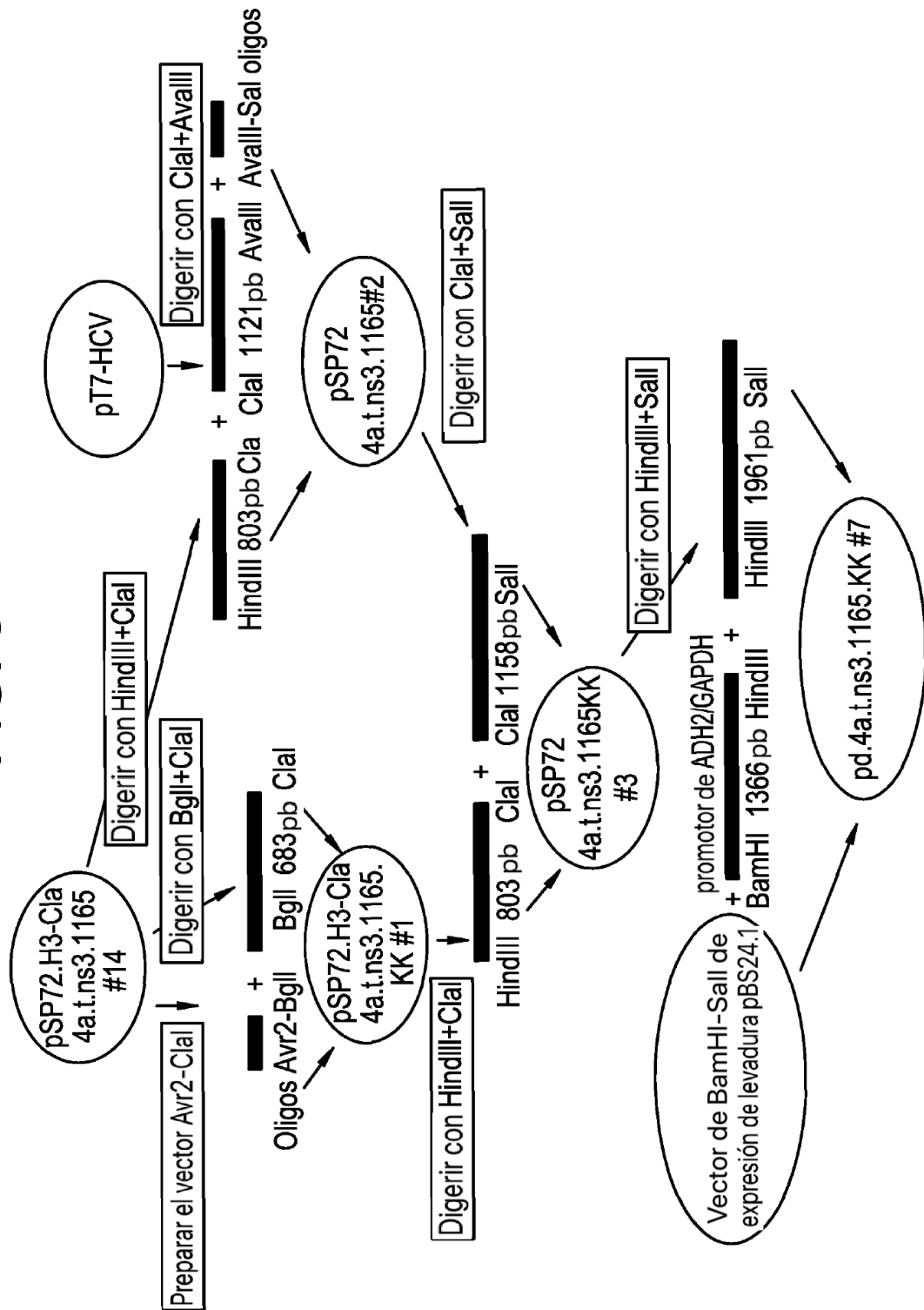


FIG. 6

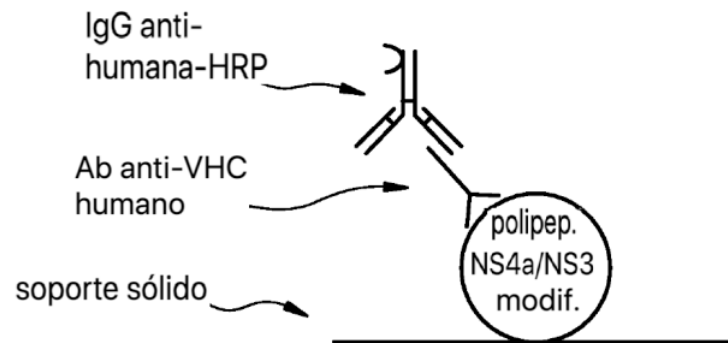


FIG. 7

