(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 277 932**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/576 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **01952160 .8**
(86) Fecha de presentación : **14.06.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1354204**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2003**

(54) Título: **Ensayo de combinación de antígeno/anticuerpo del HCV.**

(30) Prioridad: **15.06.2000 US 212082 P**
02.04.2001 US 280811 P
02.04.2001 US 280867 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

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

(72) Inventor/es: **Chien, David, Y.;**
Arcangel, Phillip;
Tandeske, Laura;
George-Nasciemento, Carlos;
Coit, Doris y
Medina-Selby, Angelica

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Ensayo de combinación de antígeno/anticuerpo del HCV.

Campo de la invención

La presente invención pertenece en general al diagnóstico vírico. En concreto, la invención se refiere a un ensayo de combinación de antígeno/anticuerpo para diagnosticar con precisión la infección por el virus de la hepatitis C.

Antecedentes de la invención

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

El VHC se identificó y se clasificó por primera vez como una causa de la HNANB por Houghten *et al*. Se conoce la secuencia genómica vírica del VHC, así como procedimientos para obtener la secuencia. Véanse, p.ej., las publicaciones internacionales nos: WO 89/04669; WO 90/11089 y WO 90/14436. El VHC tiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de 9,5 kb y es un miembro de la familia de virus de virus Flaviridae. Se han identificado al menos seis genotipos distintos pero relacionados del VHC, en base a análisis filogenéticos (Simmonds *et al*., *J. Gen. Virol*. (1993) 74: 2391-2399). El virus codifica una poliproteína simple que tiene más de 3.000 residuos de aminoácido (Choo, *et al*., *Science* (1989) 244: 359-362; Choo *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. (1991) 88: 2451-2455; Han *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. (1991) 88: 1711-1715). La poliproteína se procesa co- y post-traduccionalmente tanto en proteínas estructurales como no estructurales (NE).

En particular, según lo mostrado en la figura 1, hay varias proteínas codificadas por el genoma del VHC. El orden y la nomenclatura de los productos de escisión de las poliproteína del VHC es como sigue: NH_2-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. La escisión inicial de la poliproteína está catalizada por proteasas del huésped que liberan tres proteínas estructurales, la proteína de la nucleocápsida N-terminal (denominada "núcleo") y dos glicoproteínas de la envoltura, "E1" (también conocida como E) y "E2" (también conocida como E2/NS1), así como proteínas no estructurales (NE) que contienen las enzimas víricas. Las regiones NS son denominadas NS2, NS3, NS4 y NS5. La NS2 es una proteína de la membrana integral con actividad proteolítica. La NS2, bien sola o en combinación con la NS3, escinde el enlace de Sissle NS2-NS3 que a su vez genera el terminal N de NS3 y libera una gran poliproteína que incluye actividades tanto de la serina proteasa como de la ARN helicasa. La proteasa NS3 sirve para procesar el resto de poliproteína. La finalización de la maduración de la poliproteína se inicia mediante la escisión autocatalítica en la unión de NS3-NS4a, catalizada por la serina proteasa NS3. Las escisiones posteriores mediadas por NS3 de la poliproteína del VHC parecen implicar el reconocimiento de las uniones de escisión de la poliproteína por una molécula de NS3 de otro polipéptido. En estas reacciones, la NS3 libera un cofactor de NS3 (NS4a), dos proteínas (NS4b y NS5a) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5b).

Se ha descrito un número de polipéptidos generales y específicos útiles como reactivos inmunológicos y diagnósticos para el VHC, derivados de la poliproteína del VHC. Véase, p.ej., Houghton *et al*., publicación europea nº: 318.216 y 388.232; Choo *et al*., *Science* (1989) 244: 359-362; Kuo *et al*., *Science* (1989) 244: 362-364; Houghton *et al*., *Hepatology* (1991) 14: 381-388; Chien *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. (1992) 89: 10011-10015; Chien *et al*., *J. Gastroent. Hepatol*. (1993) *8*: S33-39; Chien *et al*., Publicación internacional nº: WO 93/00365; Chien, D. Y., publicación internacional nº: WO 94/01778. Estas publicaciones proporcionan amplios antecedentes sobre el VHC en general, así como sobre la fabricación y los usos de reactivos inmunológicos para el polipéptido del VHC.

Los procedimientos sensibles específicos para detectar e identificar vehículos del VHC y sangre o productos sanguíneos contaminados por el VHC proporcionarían un avance importante en la medicina. La hepatitis posterior a una transfusión (HPT) ocurre en aproximadamente el 10% de los pacientes transfundidos, y el VHC es responsable de hasta el 90% de estos casos. El cuidado de los pacientes, así como la prevención y la transmisión del VHC por sangre o productos sanguíneos, o por un 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, p.ej., Choo *et al*., *Science* (1989) 244: 359-362; Kuo *et al*., *Science* (1989) 244: 362-364; Choo *et al*., *Br. Med. Bull*. (1990) 46: 423-411; Ebeling *et al*., *Lancet* (1990) 335: 982-983; Van der Poel *et al*., *Lancet* (1990) 335: 558-560; Van der Poel *et al*., *Lancet* (1991) 337: 317-319; Chien, D. Y., Publicación internacional nº: WO 94-01778; Valenzuela *et al*., Publicación internacional nº: WO 97/44469; y Kashiwakuma *et al*., patente estadounidense nº: 5.871.904.

Un problema significativo encontrado con algunos ensayos basados en suero es que hay un espacio significativo entre la infección y la detección del virus, que a menudo supera los 80 días. El vacío de este ensayo puede crear un gran riesgo para los receptores de transfusiones sanguíneas. Para solucionar este problema, se han desarrollado análisis basados en ácidos nucleicos (NAT, *Nucleic Acid-based Tests*) que detectan el ARN vírico directamente, y análisis de antígenos del núcleo del VHC que analizan el antígeno vírico en lugar de la respuesta de los anticuerpos. Véase, p.ej., Kashiwakuma *et al*., patente estadounidense nº: 5.871.904; Beld *et al*., *Transfusion* (2000) 40: 575-579.

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad por herramientas de diagnóstico y pronóstico exactas y sensibles con el fin de proporcionar la atención adecuada a los pacientes, así como de prevenir la transmisión del VHC por sangre o productos sanguíneos, o por el contacto personal cercano.

Resumen de la invención

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que los anticuerpos de seroconversión del VHC son comúnmente anti-núcleo y anti-NS3 (helicasa). Por consiguiente, la invención proporciona un ensayo de combinación de antígeno del núcleo del VHC y anticuerpo de NS3 que puede detectar tanto antígenos como anticuerpos del VHC presentes en una muestra usando una matriz sólida simple.

De este modo, en una realización, la presente invención se dirige a un soporte sólido de inmunoanálisis que comprende al menos un anticuerpo anti-núcleo del VHC y al menos un epitope de NS3/4a del VHC aislado enlazados al mismo. El anticuerpo y el epitope de NS3/4a pueden ser cualquiera de las moléculas descritas en la presente memoria. Adicionalmente, el soporte sólido puede incluir cualquiera de los antígenos de fusión de múltiples epitopes descritos en la presente memoria, tal como el antígeno de fusión de múltiples epitopes que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 7A-7F.

En ciertas realizaciones, el soporte sólido comprende al menos dos anticuerpos anti-núcleo del VHC enlazados al mismo. Además, el anticuerpo anti-núcleo puede ser un anticuerpo monoclonal. Adicionalmente, el epitope NS3-4a puede ser un epitope conformacional, tal como un epitope de NS3/4a conformacional que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 4A-4D.

En otra realización, la invención se dirige a un soporte sólido de inmunoanálisis que comprende al menos dos anticuerpos monoclonales anti-núcleo del VHC y al menos un epitope conformacional de NS3/4a del VHC que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 4A-4D, unidos al mismo.

En otra realización más, la invención se dirige a un procedimiento para detectar la infección por VHC en una muestra biológica. El procedimiento comprende: (a) proporcionar un soporte sólido de inmunoanálisis según lo descrito anteriormente; (b) combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permitan a los antígenos y los anticuerpos del VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse al al menos un anticuerpo anti-núcleo y al epitope de NS3/4a, respectivamente; (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos (i) un primer anticuerpo marcado detectablemente, siendo el primer anticuerpo marcado detectablemente un anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente, estando el anticuerpo anti-núcleo marcado dirigido contra un epitope del núcleo del VHC diferente del al menos un anticuerpo anti-núcleo unido al soporte sólido; (ii) un antígeno que reacciona con un anticuerpo del VHC desde el reactivo de la muestra biológica con el epitope de NS3/4a; y (iii) un segundo anticuerpo marcado detectablemente, siendo el segundo anticuerpo marcado detectablemente reactivo con el antígeno de (ii); y (d) detectar los complejos formados entre los anticuerpos y los antígenos, si los hay, como una indicación de la infección por VHC en la muestra biológica. El epitope de NS3/4a puede ser un epitope conformacional, tal como un epitope conformacional que tenga la secuencia de NS3/4a representada en las figuras 4A-4D.

En otra realización más, la invención se dirige a un procedimiento para detectar la infección por VHC en una muestra biológica. El procedimiento comprende: (a) proporcionar un soporte sólido de inmunoanálisis con al menos dos anticuerpos anti-núcleo del VHC unidos al mismo, según lo descrito anteriormente; (b) combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permitan a los antígenos y anticuerpos del VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a los al menos dos anticuerpos anti-núcleo y al epitope de NS3/4a, respectivamente; (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos (i) un primer anticuerpo marcado detectablemente, siendo el primer anticuerpo marcado detectablemente un anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente, estando el anticuerpo anti-núcleo marcado dirigido contra un epitope del núcleo del VHC diferente de los anticuerpos anti-núcleo unidos al soporte sólido; (ii) un epitope de la región c33c de la poliproteína del VHC fusionado a una secuencia de aminoácidos de la SODh; y (iii) un segundo anticuerpo marcado detectablemente, siendo el segundo anticuerpo marcado detectablemente reactivo con la secuencia de aminoácidos de la SODh; y (d) detectar complejos formados entre los anticuerpos y los antígenos, si los hay, como una indicación de la infección por VHC en la muestra biológica. El epitope de NS3/4a puede ser un epitope conformacional, tal como un epitope conformacional que tenga la secuencia de NS3/4a representada en las figuras 4A-4D.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-núcleo puede estar dirigido contra una región N-terminal del antígeno del núcleo del VHC, tal como contra los aminoácidos 10-53 del VHC, numerados en relación con la secuencia de poliproteína VHC1, y/o el anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente puede estar dirigido contra una región C-terminal del antígeno del núcleo de VHC, tal como los aminoácidos 120-130 del VHC, numerados en relación con la secuencia de glicoproteína VHC1. Además, el antígeno que reacciona con un anticuerpo del VHC de la muestra biológica puede proceder de la región NS3, tal como un epitope de la región c33c de la poliproteína VHC y puede estar fusionado con una secuencia de aminoácidos de la superóxido dismutasa humana (SODh). En esta realización, el segundo anticuerpo marcado detectablemente es reactivo con la secuencia de aminoácidos de la SODh.

En otra realización, la invención se dirige a un procedimiento para detectar la infección por VHC en una muestra biológica. El procedimiento comprende: (a) proporcionar un soporte sólido de inmunoanálisis que incluye dos anticuerpos monoclonales anti-núcleo del VHC y un epitope conformacional que comprende la secuencia de amino 4A-4D; (b) combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permitan a los antígenos y anticuerpos del VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a los al menos dos anticuerpos anti-núcleo y al epitope conformacional de NS3/4a, respectivamente; (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos (i) un primer anticuerpo marcado detectablemente, siendo el primer anticuerpo marcado detectablemente un anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente, estando el anticuerpo anti-núcleo marcado dirigido contra un epitope del núcleo del VHC diferente de los al menos dos anticuerpos anti-núcleo unidos al soporte sólido; (ii) un epitope de la región c33c de la poliproteína del VHC fusionado a una secuencia de aminoácidos SODh; e (iii) un segundo anticuerpo marcado detectablemente, siendo el segundo anticuerpo marcado detectablemente reactivo con la secuencia de aminoácidos SODh; detectar los complejos formados entre los anticuerpos y los antígenos, si los hay, como una indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

En ciertas realizaciones, los al menos dos anticuerpos anti-núcleo están dirigidos contra la región N-terminal del antígeno del núcleo del VHC, tal como contra los aminoácidos 10-53 del VHC, numerados en relación con la poliproteína VHC1, y el anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente está dirigido contra una región C terminal del antígeno del núcleo del VHC, tal como contra los aminoácidos 120-130 del VHC, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1.

En otra realización, la invención se dirige a un procedimiento para detectar la infección por VHC en una muestra biológica. El procedimiento comprende: (a) proporcionar un soporte sólido de inmunoanálisis que incluye un antígeno de fusión de múltiples epitopes; (b) combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permitan a los antígenos y anticuerpos del VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse al al menos un anticuerpo anti-núcleo, al epitope de NS3/4a y al antígeno de fusión de múltiples epitopes; (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos (i) un primer anticuerpo marcado detectablemente, siendo el primer anticuerpo marcado detectablemente un anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente, estando el anticuerpo anti-núcleo marcado dirigido contra un epitope del núcleo del VHC diferente del al menos un anticuerpo anti-núcleo unido al soporte sólido; (ii) un primer y un segundo antígeno que reaccionan con un anticuerpo del VHC de la muestra biológica reactiva con el epitope de NS3/4a y el antígeno de fusión de múltiples epitopes, respectivamente; y (iii) un segundo anticuerpo marcado detectablemente, siendo el segundo anticuerpo marcado detectablemente reactivo con los antígenos de (ii); y (d) detectar los complejos formados entre los anticuerpos y los antígenos, si los hay, como una indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

El anticuerpo anti-núcleo puede estar dirigido contra una región N-terminal del antígeno del núcleo del VHC, y dicho primer anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente puede estar dirigido contra una región C-terminal del antígeno del núcleo del VHC, como se describe anteriormente. Además, el primer antígeno que reacciona con un anticuerpo del VHC de la muestra biológica puede comprender un epitope procedente de la región c33c de la poliproteína del VHC, y puede estar fusionado con una secuencia de aminoácidos de la SODh. En este contexto, el segundo anticuerpo marcado detectablemente es reactivo con la secuencia de aminoácidos de la SODh. Adicionalmente, el segundo antígeno que reacciona con un anticuerpo del VHC procedente de la muestra biológica puede comprender un epitope de la región c22 de la poliproteína del VHC, tal como un epitope que comprende los aminoácidos Lis_{10} a Ser_{99} de la poliproteína del VHC, con la eliminación de Arg_{47} y una sustitución de Leu por Trp en la posición 44, numerada en relación con la secuencia de poliproteína VHC1. El epitope puede estar fusionado con una secuencia de aminoácidos de la SODh. Si es así, el segundo anticuerpo marcado detectablemente es reactivo con la secuencia de aminoácidos de la SODh. El antígeno de fusión de múltiples epitopes puede comprender la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 7A-7F.

En otra realización más, la invención se dirige a un procedimiento para detectar la infección por VHC en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento: (a) proporcionar un soporte sólido de inmunoanálisis que comprenda dos anticuerpos monoclonales anti-núcleo del VHC, un epitope conformacional de NS3/4a del VHC que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 4A-4D, y un antígeno de fusión de múltiple epitopes que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 7A-7F unidos al mismo; (b) combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permitan a los antígenos y anticuerpos del VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a los al menos dos anticuerpos anti-núcleo, al epitope conformacional de NS3/4a y al antígeno de fusión de múltiples epitopes, respectivamente; (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos (i) un primer anticuerpo marcado detectablemente, siendo el primer anticuerpo marcado detectablemente un anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente, estando el anticuerpo anti-núcleo marcado dirigido contra un epitope del núcleo del VHC diferente de los al menos dos anticuerpos anti-núcleo unidos al soporte sólido; (ii) un epitope de la región c33c de la poliproteína del VHC fusionado a una secuencia de aminoácidos de la SODh y un epitope de la región c22 de la poliproteína del VHC fusionado a una secuencia de aminoácidos de la SODh; e (iii) un segundo anticuerpo marcado detectablemente, siendo el segundo anticuerpo marcado detectablemente reactivo con dichas secuencias de aminoácidos de la SODh; (d) detectar los complejos formados entre los anticuerpos y los antígenos, si los hay, como una indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

En esta realización, los al menos dos anticuerpos anti-núcleo pueden estar dirigidos contra una región N-terminal del antígeno del núcleo del VHC, tal como contra los aminoácidos 10-53 del VHC, numerados en relación con la poliproteína del VHC, y el anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente está dirigido contra una región C-

terminal del antígeno del núcleo del VHC, tal como contra los aminoácidos 120-130 del VHC, numerados en relación con la poliproteína VHC1. Además, el epitope procedente de la región c22 puede comprender los aminoácidos Lis_{10} a Ser_{99} de la poliproteína del VHC, con la eliminación de Arg_{47} y una sustitución de Leu por Trp en la posición 44, numerada en relación con la secuencia de poliproteína VHC1.

En otras realizaciones, la invención se dirige a equipos de pruebas de inmunodiagnóstico que comprenden el soporte sólido de inmunoanálisis anteriormente descrito y las instrucciones para realizar la prueba de inmunodiagnóstico.

En otras realizaciones más, la invención se dirige a procedimientos para producir un soporte sólido de inmunoanálisis que comprende: (a) proporcionar un soporte sólido; y (b) unir al menos un anticuerpo anti-núcleo del VHC tal como uno, dos o más, y al menos un epitope de NS3/4a del VHC aislado al mismo, y opcionalmente, un antígeno de fusión de múltiples epitopes al mismo. Los anticuerpos anti-núcleo, los epitopes NS3/4a y los antígenos de fusión de múltiples epitopes son según lo descrito anteriormente.

En otras realizaciones, la invención se dirige a un antígeno de fusión de múltiples epitopes que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 7A-7F, o una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad secuencial del 80%, tal como una identidad secuencial del 90% o más con la misma que reacciona específicamente con los anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica procedente de un individuo infectado por VHC. En ciertas realizaciones, el antígeno de fusión de múltiples epitopes está constituido por la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 5A-5F.

En otras realizaciones, la invención se dirige a un polinucleótido que comprende una secuencia codificante para el antígeno de fusión de múltiples epitopes anterior, un vector recombinante que comprende los polinucleótidos, células huésped transformadas con los vectores recombinantes y procedimientos para producir un antígeno de fusión de múltiples epitopes recombinante que comprende:

(a) proporcionar una población de células huésped según lo anterior; y (b) cultivar la población de células en condiciones en las que se exprese el antígeno de fusión de múltiples epitopes codificado por la secuencia codificante presente en el vector recombinante.

Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes en referencia a la siguiente descripción detallada y a las figuras anexas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una representación diagramática del genoma del VHC que representa las diversas regiones de la poliproteína de la que son derivados los reactivos del presente ensayo (proteínas y anticuerpos).

La figura 2 es un dibujo esquemático de un ensayo de combinación de anticuerpo/antígeno representativo en virtud de la invención.

La figura 3 representa la secuencia de aminoácidos de un antígeno conformacional NS3/4a representativo para su uso en los presentes ensayos. La alanina en negrita de la posición 182 está sustituida por la serina nativa que está normalmente presente en esta posición.

Las figuras de la 4A a la 4D representan el ADN y la secuencia de aminoácidos correspondiente de otro antígeno conformacional NS3/4a representativo para su uso en los presentes ensayos. Los aminoácidos en las posiciones 403 y 404 de las figuras 4A a 4D representan sustituciones de Pro por Thr y de Ile por Ser de la secuencia de aminoácidos nativa del VHC-1.

La figura 5 es un diagrama de la construcción de pd.HCV1a.ns3ns4aPI.

La figura 6 es una representación diagramática de AFME 12.

Las figuras 7A-7F representan el ADN y la correspondiente secuencia de aminoácidos de AFME 12.

La figura 8 es un dibujo esquemático de un inmunoanálisis representativo en virtud de la invención, usando AFME 12.

Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, procedimientos convencionales de Química, Bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, pertenecientes a la técnica. Tales técnicas se explican por completo en el material publicado. Véase, p.ej., "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., edición actual); Sambrook *et al*., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª edición, 1989); "Methods in Enzymology" (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

Debe indicarse que, como se usan en esta memoria y en las reivindicaciones anexas, las formas de los artículos definidos e indefinidos incluyen los referentes plurales a no ser que el contenido indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una mezcla de dos o más antígenos y similares.

A lo largo del texto, se usan las siguientes abreviaturas de aminoácido:

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

I. **Definiciones**

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, pretendiendo que sean definidos según lo que se indica a continuación.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de residuos de aminoácido, y no se limitan a una longitud mínima del producto. De este modo, se incluyen dentro de la definición péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están englobados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones de post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acilación, fosforilación y similares. Además, a efectos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza) en la secuencia nativa, siempre y cuando la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis de sitio dirigida, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de los huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación PCR.

Un polipéptido del VHC es un polipéptido, según lo definido anteriormente, derivado de la poliproteína del VHC. El polipéptido necesita no estar físicamente derivado de ninguna de las diversas cepas del VHC, pero puede ser producido sintética o recombinantemente. Además, el polipéptido puede estar derivado de cualquiera de las diversas cepas del VHC, como de las cepas 1, 2 3 ó 4 del VHC. Se conoce un número de regiones conservadas y variables entre estas cepas y, en general, las secuencias de aminoácidos de los epitopes derivados de estas regiones tendrán un grado elevado de homología secuencial, p.ej., una homología secuencial aminoacídica de más del 30%, preferiblemente, de más del 40%, cuando las dos secuencias estén alineadas. De este modo, por ejemplo, el término polipéptido "NS3/4a" se refiere a un NS3/4a nativo de cualquiera de las diversas cepas de VHC, así como a análogos, muteínas y fragmentos inmunogénicos de NS3/4a, según lo definido más adelante. Se conocen los genotipos completos de muchas de estas cepas. Véase, p.ej., la patente estadounidense nº: 6.150.087 y los números de acceso del banco de genes AJ238800 y AJ238799.

Los términos "análogo" y "muteína" se refieren a derivados biológicamente activos de la molécula de referencia, o a fragmentos de tales derivados, que conservan la actividad deseada, tal como una inmunorreactividad en los ensayos descritos en la presente memoria. En general, el término "análogo" se refiere a compuestos que tienen una secuencia polipeptídica nativa y una estructura con una o más adiciones, sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza) y/o eliminaciones de aminoácidos, en relación con la molécula nativa, siempre y cuando las modificaciones no destruyan la actividad inmunogénica. El término "muteína" se refiere a péptidos que tienen uno o más mímicos peptídicos ("peptoides"), tales como aquéllos descritos en la publicación internacional nº: WO 91/04282. Preferiblemente, el análogo o la muteína tiene al menos la misma inmunoactividad que la molécula nativa. Los procedimientos para fabricar análogos y muteínas de polipéptido son conocidos en la técnica y se describen más adelante.

Los análogos particularmente preferidos incluyen sustituciones que son conservativas en la naturaleza, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar en una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Específicamente, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (a) ácidos: aspartato y glutamato; (2) básicos: lisina, arginina, histidina; (3) no polares: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga: glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina algunas veces se clasifican como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonablemente predecible que un reemplazo aislado de leucina con isoleucina o valina, un aspartato con glutamato, una treonina con

una serina, o un reemplazo conservativo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente no tenga un efecto importante sobre la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o incluso hasta aproximadamente 15-25 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o cualquier número entero entre 5-25, siempre y cuando la función deseada de la molécula permanezca intacta. Cualquier experto en la técnica puede determinar fácilmente regiones de la molécula de interés que pueden tolerar un cambio por referencia a los gráficos de Hopp/Woods y Kyte-Doolittle, conocidos en la técnica.

"Fragmento" pretende significar un polipéptido constituido por sólo una parte de la secuencia y la estructura polipeptídica de longitud completa intacta. El fragmento puede incluir una eliminación C-terminal y/o una eliminación N-terminal del polipéptido nativo. Un "fragmento inmunogénico" de una determinada proteína del VHC incluirá, en general, al menos aproximadamente 5-10 residuos de aminoácido contiguos de la molécula de longitud completa, preferiblemente, al menos aproximadamente 15-25 residuos de aminoácido contiguos de la molécula de longitud completa, y lo más preferible, al menos 20-50 o más residuos de aminoácido contiguos de la molécula de longitud completa, que definen un epitope, o cualquier número entero entre 5 aminoácidos y la secuencia de longitud completa, con la condición de que el fragmento en cuestión conserve la inmunorreactividad en los ensayos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los fragmentos inmunogénicos preferidos incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos del núcleo del VHC que comprenden, p.ej., los aminoácidos 10-45; 10-53; 67-88 y 120-130 de la poliproteína, el epitope 5-1-1 (en la región NS3 del genoma viral), así como los epitopes definidos derivados de las regiones E1, E2, c33c (NS3), c100 (NS4), NS3/4a y NS5 de la poliproteína del VHC, así como cualquiera de los otros diversos epitopes identificados de la poliproteína del VHC. Véase, p.ej., Chien *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. (1992) 89: 10011-10015; Chien *et al*., *J. Gastroent. Hepatol*. (1993) 8: S33-39; Chien *et al*., Publicación internacional nº: WO 93/00365; Chien, D.Y., Publicación internacional nº: WO 94/01778; Patentes estadounidenses nº 6.150.087 y 6.121.020.

El término "epitope" como se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia de al menos aproximadamente 3 a 5, preferiblemente, de aproximadamente 5 a 10 ó 15, y de 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 larga se une a un anticuerpo generado en respuesta a tal secuencia. No existe un límite superior crítico de la longitud del fragmento, que puede comprender casi una longitud completa de la secuencia de proteína, o incluso una proteína de fusión que comprenda dos o más epitopes de la poliproteína del VHC. Un epitope para su uso en la presente invención no se limita a un polipéptido que tenga la secuencia exacta de la porción de la proteína precursora a partir de la cual deriva. De hecho, los genomas víricos están en un estado de constante flujo y contienen varios dominios variables que muestran grados de variabilidad relativamente elevada entre los aislados. Por tanto, el término "epitope" engloba secuencias idénticas a la secuencia nativa, así como modificaciones de la secuencia nativa, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa).

Las regiones de un polipéptido dado que incluyen un epitope pueden ser identificadas usando cualquier número de técnicas de mapeado de epitopes conocidas en la técnica. Véase, p.ej., "Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology", vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, se pueden determinar epitopes lineales mediante p.ej., la síntesis simultánea de grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de proteína y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos todavía están enlazados a los soportes. Tales técnicas son conocidas en la técnica y se describen en, p.ej., la patente estadounidense nº: 4.708.871; Geysen *et al*. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. 81: 3998-4002; Geysen *et al*. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. 82: 178-182; Geysen *et al*., (1986) *Molec. Immunol*. 23: 709-715. Mediante el uso de tales técnicas, se ha identificado un número de epitopes del VHC. Véase, p.ej., Chien *et al*., "Viral Hepatitis and Liver Disease" (1994) pp. 320-324, y más adelante. De manera similar, los epitopes conformacionales se identifican fácilmente mediante la determinación de la configuración espacial de los aminoácidos tal como mediante, p.ej., cristalografía por rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p.ej., "Epitope Mapping Protocols" *supra*. También se pueden identificar regiones antigénicas de proteínas usando gráficos estándar de antigenicidad e hidropatía, tales como las calculadas usando, p.ej., él programa informático Omiga versión 1.0 disponible en el Grupo Molecular de Oxford. Este programa informático emplea el procedimiento de Hopp/Woods, Hopp *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1981) 78: 3824-3828 para determinar los perfiles de antigenicidad y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte *et al*., *J. Mol. Biol*. (1982) 157: 105-132 para gráficos de hidropatía.

Como se usa en la presente memoria, el término "epitope conformacional" se refiere a una porción de una proteína de longitud completa, o un análogo o una muteína de la misma, que tiene características estructurales nativas con respecto a la secuencia de aminoácidos codificante del epitope de la proteína natural de longitud completa. Las características estructurales nativas incluyen, pero no se limitan a, glicosilación y una estructura tridimensional. La longitud de la secuencia que define el epitope puede estar sujeta a amplias variaciones, pues se cree que estos epitopes están formados por la forma tridimensional del antígeno (p.ej., doblado). Por tanto, los aminoácidos que definen el epitope pueden ser relativamente pocos en número, pero estar ampliamente dispersados a lo largo de la longitud de la molécula (o incluso en diferentes moléculas en el caso de los dímeros, etc), siendo llevados a la configuración del epitope correcto mediante un plegamiento. Las porciones del antígeno entre los residuos que definen el epitope pueden no ser de importancia fundamental para la estructura conformacional del epitope. Por ejemplo, la eliminación o la sustitución de estas secuencias intercaladas puede no afectar al epitope conformacional siempre que se mantengan las secuencias críticas para la configuración del epitope (p.ej., las cisteínas que participan en la unión de disulfuros, los sitios de glicosilación, etc.).

Los epitopes conformacionales presentes en la región NS3/4a son fácilmente identificados usando los procedimientos anteriormente tratados. Además, se puede determinar fácilmente la presencia o la ausencia de un epitope conformacional en un polipéptido dado a través del rastreo del antígeno de interés con un anticuerpo (suero policlonal o monoclonal contra el epitope conformacional) y la comparación de su reactividad con la de una versión desnaturalizada del antígeno que conserva sólo epitopes lineales (si conserva alguno). En tal rastreo en el que se usan anticuerpos policlonales, puede ser ventajoso absorber el suero policlonal primero con el antígeno desnaturalizado y ver si conserva los anticuerpos contra el antígeno de interés. Adicionalmente, en el caso de NS3/4a, una molécula que conserve la configuración nativa también tendrá proteasa y, opcionalmente, actividades enzimáticas de la helicasa. Tales actividades pueden ser detectadas usando ensayos enzimáticos, según lo descrito más adelante.

Preferiblemente, se produce un epitope conformacional recombinantemente y se expresa en una célula a partir de la cual es extraíble en condiciones que conservan sus características estructurales deseadas, p.ej., sin la desnaturalización del epitope. Tales células incluyen células bacterianas, de levadura, de insectos y de mamíferos. La expresión y el aislamiento de epitopes conformacionales recombinantes a partir de la poliproteína del VHC están descritos en, p.ej., las publicaciones internacionales nº: WO 96/04301, WO 94/01778, WO 95/33053, WO 92/08734. Alternativamente, es posible expresar los antígenos y volver a naturalizar además la proteína tras la recuperación. También se entiende que la síntesis química también puede proporcionar mimitopes antigénicos conformacionales que reaccionan mediante cruzamiento con el epitope conformacional del antígeno "nativo".

El término "antígeno de fusión de múltiples epitopes" o "AFME" como se usa en la presente memoria se refiere a un polipéptido en el que múltiples antígenos del VHC son parte de una única cadena continua de aminoácidos, cuya cadena no tiene lugar en la naturaleza. Los antígenos del VHC pueden estar conectados directamente entre sí mediante enlaces peptídicos o pueden estar separados de secuencias intercaladas de aminoácidos. Los antígenos de fusión también pueden contener secuencias exógenas a la poliproteína del VHC. Además, las secuencias del VHC presentes pueden ser de múltiples genotipos y/o aislados del VHC. Los ejemplos de AFME concretos para su uso en los presentes inmunoanálisis se detallan en, p.ej., la publicación internacional nº: WO 97/44469, y están descritos más adelante.

Un "anticuerpo" se refiere a una molécula que, a través de medios químicos o físicos, se une específicamente a un polipéptido de interés. Por lo tanto, un anticuerpo del núcleo del VHC es una molécula que se une específicamente a la proteína del núcleo el VHC. El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, incluye los anticuerpos obtenidos tanto de preparaciones policlonales como monoclonales, así como, lo siguiente: moléculas de anticuerpo híbrido (quimérico) (véase, por ejemplo, Winter *et al*. (1991) *Nature* 349: 293-299; y la patente estadounidense nº: 4.816.567); fragmentos $F(ab')_2$ y F(ab); moléculas de Fv (heterodímeros no covalentes, véase, por ejemplo, Inbar. *et al*. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. 69: 2659-2662; y Ehrlich *et al*., (1980) *Biochem*. 19: 4091-4096); moléculas de Fv monocatenarias (Fvm) (véase, por ejemplo, Huston *et al*. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. 85: 5879-5883); constructos de fragmentos de anticuerpo diméricos y triméricos; minicuerpos (véase, p.ej., Pack *et al*. (1992) *Biochem* 31: 1579-1584; Cumbre *et al*. (1992) *J. Immunology* 149B: 120-126); moléculas de anticuerpos humanizados (véase, por ejemplo, Riechmann *et al*. (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyan *et al*. (1988) *Science* 239: 1534-1536; y la publicación de patente británica nº: GB 2.276.169, publicada el 21 de septiembre de 1994); y cualquier fragmento funcional obtenido de tales moléculas, conservando tales fragmentos las propiedades de unión inmunológica de la molécula de anticuerpo precursora.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición de anticuerpo que tiene una población de anticuerpos homogénea. El término no se limita a la especie o a la fuente del anticuerpo, ni pretende estar limitada por la manera en la que se forma. Por tanto, el término engloba a los anticuerpos obtenidos a partir de hibridomas murinos, así como a los anticuerpos monoclonales humanos obtenidos usando hibridomas humanos en lugar de murinos. Véase, p.ej., Cote *et al*., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, 1985, p. 77.

Una proteína "recombinante" es una proteína que conserva la actividad deseada y que ha sido preparada mediante técnicas de ADN recombinante según lo descrito en la presente memoria. En general, el gen de interés es clonado y luego expresado en organismos transformados, según lo descrito más adelante. El organismo huésped expresa el gen foráneo para producir la proteína en condiciones de expresión.

"Aislado" pretende significar, cuando se refiere a un polipéptido, que la molécula indicada está separada y diferenciada del organismo completo con el que la molécula se encuentra en la naturaleza o está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "aislado" con respecto a un polinucleótido es una molécula de ácido nucleico que carece, en conjunto o en parte, de secuencias normalmente asociadas con él en la naturaleza; o una secuencia, como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterológas en asociación con la misma; o una molécula desasociada del cromosoma.

"Determinante antigénico equivalente" pretende significar un determinante antigénico de diferentes subespecies o cepas del VHC, tales como de las cepas 1, 2 ó 3 del VHC. Más específicamente, se conocen los epitopes, tales como 5-1-1, y tales epitopes varían entre las cepas 1, 2 y 3. Por tanto, el epitope 5-1-1 de las cepas tridimensionales son determinantes antigénicos equivalentes y por tanto son "copias" incluso aunque sus secuencias no sean idénticas. En general, las secuencias aminoacídicas de los determinantes antigénicos equivalentes tendrán un grado elevado de

homología secuencial, p.ej., una homología secuencial de aminoácidos de más del 30%, preferiblemente, de más del 40%, cuando las dos secuencias estén alineadas.

"Homología" se refiere a la similitud en porcentaje entre dos restos de polinucleótido o dos restos de polipéptido. Dos secuencias de ADN o dos secuencias de polipéptido son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias muestran al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente, al menos el aproximadamente 75%, más preferiblemente, al menos aproximadamente del 80%-85%, preferiblemente, al menos aproximadamente el 90%, y lo más preferible, al menos aproximadamente del 95%-98% de similitud secuencial frente a una longitud definida de la secuencia de ADN o polipéptido específica.

En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de dos secuencias de polinucleótido o de polipéptido, respectivamente. La identidad en porcentaje puede ser determinada mediante una comparación directa de la información secuencial entre dos moléculas mediante el alineamiento de las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo entre la longitud de la secuencia más corta y multiplicando el resultado entre 100.

Se pueden usar programas informáticos fácilmente disponibles para facilitar el análisis de la similitud y la identidad, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en "Atlas of Protein Sequence and Structure", M.O. Dayhoff ed., 5 Supl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, "Advances in *Appl Math*". 2: 482-489, 1981 para el análisis de péptidos. Los programas para determinar la similitud y la identidad de las secuencias de nucleótidos están disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI), por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en al algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package anteriormente referido. Por ejemplo, se puede determinar el porcentaje de similitud de una determinada secuencia nucleotídica con respecto a una secuencia de referencia usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización de hueco de seis posiciones de nucleótido.

Otro procedimiento para establecer el porcentaje de similitud en el contexto de la presente invención consiste en usar 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, CA). Desde este juego de paquetes, se puede emplear el algoritmo de Smith-Waterman en el que se usan los parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, una penalización de apertura de hueco de 12, una penalización de extensión de hueco de uno y un hueco de seis). A partir de los datos generados, el valor de "coincidencia" refleja la "similitud secuencial". Hay otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o de similitud entre secuencias generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es el BLAST, usado con los parámetros por defecto. Por ejemplo, se pueden usar el BLASTN y el BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; esperado = 10; matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificado por = HIGH SCORE; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ +PDB +GenBank CDS translations + Swiss Protein + Spupdate + PIR. Se puede encontrar información sobre estos programas en la siguiente dirección de Internet: http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST.

Alternativamente, se puede determinar la homología mediante la hibridación de polinucleótidos en condiciones que formen dúplex estables entre las regiones homólogas, seguida por la digestión con nucleasa o nucleasas específicas de monocatenarios, y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden ser identificadas en un experimento de hibridación Southern en, por ejemplo, condiciones restrictivas, según lo definido para el sistema en concreto. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas pertenece al alcance de la técnica. Véase, p.ej., Sambrook *et al*., *supra*; "DNA Cloning", *supra*; "Nucleic Acid Hybridization", *supra*.

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

"Ligado o ligada operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados para realizar su función deseada. De este modo, un promotor dado ligado operativamente a una secuencia codificante es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante cuando los factores de transcripción apropiados, etc., estén presentes. El promotor necesita no estar contiguo con la secuencia codificante, siempre y cuando funcione para dirigir la expresión de la misma. Así, por ejemplo, las secuencias intercaladas no traducidas aunque transcritas pueden estar presentes entre la secuencia promotora y la secuencia codificante, como también pueden estar intrones transcritos, y la secuencia promotora puede seguir siendo considerada "operativamente ligada" a la secuencia codificante.

Un "elemento de control" se refiere a una secuencia de polinucleótido que facilita la expresión de una secuencia codificante a la que está ligada. El término incluye promotores, secuencias de terminación de la transcripción, dominios

reguladores secuencia arriba, señales de poliadenilación, regiones no traducidas, incluyendo 5'-UTR y 3'-UTR, y cuando procede, secuencias líder y potenciadores, que proporcionan colectivamente la transcripción y la traducción de una secuencia codificante en una célula huésped.

Un "promotor", como se usa en la presente memoria, es una región reguladora de ADN capaz de unir ARN polimerasa en una célula huésped e iniciar la transcripción de una secuencia codificante (en dirección 3') secuencia arriba ligada operativamente a la misma. A efectos de la presente invención, una secuencia promotora incluye el número mínimo de bases o elementos necesario para iniciar la transcripción de un gen de interés a niveles detectables sobre el fondo. En la secuencia promotora hay un sitio de iniciación 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 contendrán, pero no siempre, cajas TATA y cajas CAT.

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

"Un casete de expresión" o una "construcción de expresión" se refiere a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de la secuencia o las secuencias, o el gen o los genes de interés. El casete de expresión incluye los elementos de control, según lo descrito anteriormente, tales como un promotor que está ligado operativamente a (para dirigir la transcripción de) la secuencia o las secuencias, o el gen o los genes de interés, y a menudo también incluye una secuencia de poliadenilación. En ciertas realizaciones de la invención, el casete de expresión descrito en la presente memoria puede estar contenido en un constructo plasmídico. Además de los componentes del casete de expresión, el constructo plasmídico también puede incluir uno o más marcadores seleccionables, una señal que permita al constructo plasmídico existir como ADN monocatenario (p.ej., un origen M13 de replicación), al menos un sitio de clonación múltiple y un origen "mamífero" de replicación (p.ej., un origen de SV40 o de adenovirus de replicación).

"Transformación", como se usa en la presente memoria, se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, independientemente del procedimiento usado para la inserción: por ejemplo, la transformación mediante reabsorción directa, la transfección, la infección y similares. Para procedimientos particulares de transfección, véase más adelante. El polinucleótido exógeno puede ser mantenido como un vector no integrado, por ejemplo, un episoma, o alternativamente, puede estar integrado en el genoma huésped.

Una "célula huésped" es una célula que ha sido transformada, o es capaz de sufrir una transformación, mediante una secuencia exógena de ADN.

Un "soporte sólido común" se refiere a una matriz sólida simple a la que se unen los polipéptidos del VHC usados en los presentes inmunoanálisis mediante enlace covalente o mediante medios no covalentes tales como la adsorción hidrófoba.

"Inmunológicamente reactivo" significa que el antígeno en cuestión reaccionará específicamente con los anticuerpos anti-VHC presentes en la muestra biológica procedente de un individuo infectado por VHC.

"Complejo inmune" se refiere a la combinación formada cuando un anticuerpo se une a un epitope sobre un antígeno.

Como se usa en la presente memoria, una "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o fluido aislada de un sujeto, incluyendo pero no limitándose a, por ejemplo, sangre, plasma, suero, materia fecal, orina, médula ósea, bilis, fluido espinal, fluido linfático, muestras de piel, secreciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias y también muestras de constituyentes de cultivos celulares *in vitro* que incluyen, pero no se limitan a, medios acondicionados resultantes del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, p.ej., células recombinantes y componentes celulares.

Como se usan en la presente memoria, los términos "etiqueta" y "etiqueta detectable" se refieren a una molécula capaz de ser detectada, incluyendo pero no limitándose a, isótopos radioactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromóforos, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, cromóforos, tintes, iones metálicos, suelos metálicos, ligandos (p.ej., biotina, estrepavidina o haptenos) y similares. El término "fluorescente" se refiere a una sustancia o a una porción de la misma que es capaz de mostrar una fluorescencia en el intervalo detectable. Los ejemplos particulares de etiquetas que pueden ser usadas en virtud de la invención incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante (HRP, *Horse Radish Peroxidase*), fluoresceína, FITC, rodamina, dansil, umbelliferona, dimetil-acridinio-éster (DMAE), rojo Texas, luminol, NADPH y α-β-galactosidasa.

II. **Modos de llevar a cabo la invención**

Antes de describir la presente invención en detalle, se entenderá que esta invención no está limitada a las formulaciones o los parámetros de procesamiento particulares y, como tales, por supuesto, pueden variar. Se entenderá también que la terminología usada en la presente memoria es sólo para describir las realizaciones concretas de la invención, y no pretende ser restrictiva.

Aunque se puede usar un número de composiciones y procedimientos similares o equivalentes a aquéllos descritos en la presente memoria en la práctica de la presente invención, en la presente memoria, se describen los materiales y los procedimientos preferidos.

Según lo indicado anteriormente, la presente invención se basa en el descubrimiento de nuevos procedimientos de diagnóstico para detectar pronto y con exactitud la infección por VHC. Los procedimientos se basan en la identificación y el uso de anticuerpos y antígenos del VHC altamente inmunogénicos que están presentes durante las etapas tempranas de la seroconversión del VHC, aumentando así la exactitud de la detección y reduciendo la incidencia de resultados falsos. Los procedimientos pueden ser practicados convenientemente en un único formato de ensayo.

Más concretamente, el ensayo se realiza sobre un soporte sólido al que se ha enlazado uno o más anticuerpos anti-núcleo del VHC (dirigidos contra bien los mismos o diferentes epitopes del núcleo del VHC) y un epitope derivado de la región NS3/4a de la poliproteína del VHC. Los ejemplos de anticuerpos anti-núcleos particulares útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo tales como anticuerpos monoclonales, epitopes dirigidos en contra en la región nuclear encontrada entre los aminoácidos 10-53; los aminoácidos 10-45; los aminoácidos 67-88; los aminoácidos 120-130, o anticuerpos dirigidos contra cualquiera de los epitopes del núcleo identificados en, p.ej., Houghton *et al*., patente estadounidense nº: 5.350.671; Chien *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. (1992) 89: 10011-10015; Chien *et al*., *J. Gastroent. Hepatol*. (1993) 8: S33-39; Chien *et al*., publicación internacional nº: WO 93/00365; Chien, D.Y. Publicación internacional nº: WO 94/01778; las solicitudes de patente estadounidense permitidas de propiedad común con número de serie 08/403.590 y 08/4440818.

La región NS3/4a de la poliproteína del VHC ha sido descrita, siendo reveladas la secuencia de aminoácidos y la estructura global de la proteína en, p.ej., Yao *et al*., *Structure* (noviembre, 1999) 7: 1353-1363; Sali *et al*., *Biochem*. (1998) 37: 3392-3401; y Bartenschlager, R. J. *Viral Hepat*. (1999) 6: 165-181. Véase, también, Dasmahapatra *et al*., patente estadounidense nº: 5.843.752. Los presentes inmunoanálisis utilizan al menos un epitope conformacional derivado de la región NS3/4a que existe en la configuración como se encuentra en la partícula de VHC natural o su producto infectivo, según lo evidenciado por la conservación de la proteasa y, opcionalmente, las actividades enzimáticas de la helicasa normalmente mostradas por el producto génico NS3/4a y/o la inmunorreactividad del antígeno con los anticuerpos en una muestra biológica procedente de un sujeto infectado por el VHC, y una pérdida de la inmunorreactividad del epitope ante la desnaturalización del antígeno. Por ejemplo, es posible afectar al epitope conformacional mediante el calentamiento, el cambio de pH a un pH extremadamente ácido o básico, o mediante la adición de desnaturalizantes orgánicos conocidos, tales como ditiotreitol (DTT) o un detergente apropiado. Véase, p.ej, "Protein Purification Methods", un enfoque práctico (E. L. V. Harris y S. Angal eds., IRL Press) y el producto desnaturalizado comparado con el producto que no es tratado según lo anterior.

Es posible determinar la actividad de la proteasa y la helicasa usando ensayos enzimáticos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar la actividad de la proteasa usando ensayos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Takeshita *et al*., *Anal. Biochem*. (1997) 247: 242-246; Kakiuchi *et al*., *J. Biochem*. (1997) 122: 749-755; Sali *et al*., *Biochemistry* (1998) 37: 3392-3401; Cho *et al*., *J. Virol. Meth*. (1998) 72: 109-115; Cerretani *et al*., *Anal. Biochem*. (1999) 266: 192-197; Zhang *et al*., *Anal. Biochem*. (1999) 270: 268-275; Kakiuchi *et al*., *J. Virol. Meth*. (1999) 80: 77-84; Fowler *et al*., *J. Biomol. Screen*. (2000) 5: 153-158; y Kim *et al*., *Anal. Biochem*. (2000) 284: 42-48. En los ejemplos que figuran a continuación, se expone un ensayo particularmente conveniente para analizar la actividad de la proteasa.

De manera similar, los ensayos de la actividad de la helicasa son conocidos en la técnica y es posible determinar la actividad de la helicasa de un epitope de NS3/4a usando, por ejemplo, un ensayo ELISA, según lo descrito en, p.ej., Hsu *et al*., *Biochem. Biophys. Res. Commun*. (1998) 253: 594-599; un sistema de ensayo de centelleo por proximidad, según lo descrito en Kyono *et al*., *Anal. Biochem*. (1998) 257: 120-126; ensayos de rastreo de alto rendimiento según lo descrito en, p. ej., Hicham *et al*., *Antiviral Res*. (2000) 46: 181-193 y Kwong *et al*., *Methods Mol. Med*. (2000) 24: 97-116; así como mediante otros procedimientos de ensayo conocidos en la técnica. Véase, p.ej., Khu *et al*., *J. Virol*. (2001) 75: 205-214; Utama *et al*., *Virology* (2000) 273: 316-324; Paolini *et al*., *J. Gen. Virol* (2000) 81: 1335-1345; Preugschat *et al*., *Biochemistry* (2000) 39: 5174-5183; Preugschat *et al*., *Methods Mol. Med*. (1998) 19: 353-364; y Hesson *et al*., *Biochemistry* (2000) 39: 2619-2625.

La longitud del antígeno es suficiente para mantener un epitope conformacional inmunorreactivo. Habitualmente, el polipéptido que contiene el antígeno usado será de una longitud casi completa. Sin embargo, el polipéptido también puede estar truncado para, por ejemplo, aumentar la solubilidad o mejorar la secreción. En general, el epitope conformacional encontrado en NS3-4a es expresado como un polipéptido recombinante en una célula, y este polipéptido proporciona el epitope en una forma deseada, según lo descrito detalladamente a continuación.

En la figura 3 y las figuras 4A a 4D se muestran las secuencias de aminoácidos representativas para los polipéptidos de NS3/4a. La alanina en negrita que se presenta en la posición 182 de la figura 3 está sustituida por la serina nativa encontrada en esta posición con el fin de evitar la autocatálisis de la molécula que, de lo contrario, podría ocurrir. La secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 2-686 de las figuras 4A a 4D corresponde a las posiciones de los aminoácidos 1027-1711 del VHC-1. En la posición 1, se muestra un codón iniciador (ATG) codificante para Met. Adicionalmente, la Thr que ocurre normalmente en la posición 1428 del VHC-1 (posición del aminoácido 403 de la figura 4) está mutada a Pro, y la Ser, que ocurre normalmente en la posición 1429 del VHC-1, (posición del

aminoácido 404 de la figura 4) está mutada a Ile. Sin embargo, bien la secuencia nativa, con o sin una Met N-terminal, el análogo representado, con o sin la Met N-terminal, u otros análogos y fragmentos pueden ser usados en los presentes ensayos, siempre y cuando el epitope se produzca usando un procedimiento que conserve o reestablezca su configuración nativa tal como la conservación de la actividad de la proteasa y, opcionalmente, la actividad de la helicasa. Tanto Dasmahapatra *et al*., patente estadounidense nº: 5.843.752 como Zhang *et al*., patente estadounidense nº: 5.990.276 describen análogos de NS3/4a.

La proteasa NS3 de NS3/4a se encuentra por las posiciones 1027-1207, numeradas en relación con el VHC-1, las posiciones 2-182 de la figura 4. La estructura de la proteasa NS3 y el sitio activo son conocidos. Véase, p.ej., De Francesco *et al*., *Antivir. Ther*. (1998) 3: 99-109; Koch *et al*., *Biochemistry* (2001) 40: 631-640. Los cambios de la secuencia nativa que normalmente serán tolerados serán aquéllos exteriores al sitio activo de la molécula. Particularmente, es deseable mantener los aminoácidos 1- ó 2-155 de la figura 4 con pocas o solo sustituciones conservativas. Los aminoácidos que tienen lugar más allá de 155 tolerarán cambios mayores. Adicionalmente, si se usan fragmentos de la secuencia de NS3/4a encontrados en la figura 4, estos fragmentos incluirán generalmente al menos los aminoácidos 1- ó 2-155, preferiblemente, los aminoácidos 1- ó 2-175, y lo más preferible, los aminoácidos 1- ó 2-182, con o sin la Met N-terminal. El dominio de la helicasa se encuentra por las posiciones 1193-1657 del VHC-1 (las posiciones 207-632 de la figura 4). De este modo, si se desea la actividad de la helicasa, se mantendrá esta porción de la molécula con pocos o sólo con cambios conservativos. Cualquier experto en la técnica puede determinar fácilmente otras regiones que tolerarán cambios basados en la estructura conocida de NS3/4a.

El soporte sólido también puede comprender otros antígenos. Por ejemplo, se pueden enlazar antígenos de fusión de múltiples epitopes (denominados AFME), según lo descrito en la publicación internacional nº: WO 97/44469, al soporte sólido para su uso en los presentes ensayos. Tales AFME incluyen múltiples epitopes derivados de dos o más de las diversas regiones víricas mostradas en la figura 1 y la tabla 1. En concreto, según lo mostrado en la figura 1 y la tabla 1, una poliproteína de VHC, al escindirse, produce al menos 10 productos distintos, en el orden de NH_2-núcleo-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NSSa-NSSb-COOH. El polipéptido del núcleo tiene lugar en las posiciones 1-191, numeradas en relación con el VHC-1 (véase, Choo *et al*., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU*. 88: 2451-2455, para el genoma del VHC-1). Este polipéptido se procesa en mayor profundidad para producir un polipéptido del VHC con aproximadamente los aminoácidos 1-173. Los polipéptidos de la envoltura, E1 y E2, tienen lugar por las posiciones 192-383 y 384-746, respectivamente. El dominio P7 se encuentra por las posiciones 747-809. La NS2 es una proteína de la membrana integral con actividad proteolítica y se encuentra por las posiciones 810-1026 de la poliproteína. La NS2, bien sola o en combinación con NS3 (encontrada por las posiciones 1027-1657), escinde el enlace de Sissle NS2-NS3 que a su vez genera el terminal N de NS3 y libera una gran poliproteína que incluye tanto actividades de la serina proteasa como de la ARN helicasa. La proteasa NS3, encontrada por las posiciones 1027-1207, sirve para procesar la poliproteína restante. La actividad de la helicasa se encuentra por las posiciones 1193-1657. La finalización de la maduración de la poliproteína es iniciada mediante la escisión autocatalítica en la unión NS3-NS4a, catalizada por la serina proteasa NS3. Las posteriores escisiones mediadas por NS3 de la poliproteína del VHC parecen implicar el reconocimiento de uniones de escisiones de poliproteínas por una molécula NS3 de otro polipéptido. En estas reacciones, NS3 libera un cofactor NS3 (NS4a, encontrado por las posiciones 1658-1711), dos proteínas (NS4b encontrada por las posiciones 1712-1972 y NS5a encontrada por las posiciones 1973-2420) y ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5b encontrada por las posiciones 2421-3011).

Tabla 1

Dominio	Límites aproximados*
N (núcleo)	1–191
E1	192–383
E2	384–746
P7	747–809
NS2	810–1026
NS3	1027–1657
NS4a	1658–1711
NS4b	1712–1972

NS5a	1973–2420
NS5b	2421–3011
Numerados en relación con el VHC–1. Véase Choo *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 88: 2451–2455	

Los múltiples antígenos del VHC forman parte de una única cadena continua de aminoácidos, no teniendo lugar dicha cadena en la naturaleza. Así, el orden lineal de los epitopes es diferente de su orden lineal en el genoma en el que ocurren. El orden lineal de las secuencias de los AFME para su uso en la presente memoria está preferiblemente organizado para obtener una antigenicidad óptima. Preferiblemente, los epitopes proceden de más de una cepa del VHC, proporcionando así la capacidad añadida de detectar múltiples cepas del VHC en un único ensayo. De este modo, los AFME para su uso en la presente memoria pueden comprender diversas regiones inmunogénicas derivadas de la poliproteína descrita anteriormente. Además, se puede usar en los AFME una proteína resultante de un marco de lectura de la región central de la poliproteína, tal como se describe en la publicación internacional nº: WO 99/63941. Si se desea, pueden ocurrir al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más de los uno o más epitopes derivados de la poliproteína del VHC en la proteína de fusión.

Por ejemplo, se pueden incluir en el antígeno AFME epitopes derivados de, p.ej., la región hipervariable de E2, tal como una región que abarca los aminoácidos 384-410 ó 390-410. Un epitope de E2 particularmente eficaz es uno que incluya una secuencia consenso derivada de esta región, tal como la secuencia consenso Gli-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gli-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gli-Ala-Lis-Gln-Asn, que representa una secuencia consenso para los aminoácidos 390-410 del genoma del VHC de tipo 1. Un epitope de E2 representativo presente en un AFME de la invención puede comprender un epitope híbrido que abarque los aminoácidos 390-444. Tal epitope de E2 híbrido puede incluir una secuencia consenso que representa los aminoácidos 390-410 fusionada a la secuencia de aminoácidos nativa para los aminoácidos 411-444 del E2 del VHC.

Adicionalmente, los antígenos pueden ser derivados de diversas cepas del VHC. Se conocen múltiples cepas víricas del VHC, y los epitopes derivados de cualquiera de estas cepas pueden ser usados en una proteína de fusión. Se sabe que cualquier especie dada de organismo varía de un organismo individual a otro, y además que un organismo dado tal como un virus puede tener un número de diferentes cepas. Por ejemplo, según lo explicado anteriormente, el VHC incluye al menos 6 genotipos. Cada uno de estos genotipos incluye determinantes antigénicos equivalentes. Más específicamente, cada cepa incluye un número de determinantes antigénicos que están presentes en todas las cepas del virus, pero que se diferencian ligeramente de una cepa vírica a otra. Por ejemplo, el VHC incluye el determinante antigénico conocido como 5-1-1 (véase la figura 1). Este determinante antigénico concreto aparece de tres formas diferentes de tres cepas víricas diferentes del VHC. Por consiguiente, en una realización preferida de la invención, las tres formas del 5-1-1 aparecen en el antígeno de fusión de múltiples epitopes usado en los presentes inmunoanálisis. De manera similar, los determinantes antigénicos equivalentes de la región del núcleo de diferentes cepas del VHC también pueden estar presentes. En general, los determinantes antigénicos equivalentes tienen un grado elevado de homología en términos de secuencia aminoacídica, cuyo grado de homología es generalmente del 30% o mayor, preferiblemente, del 40% o mayor, cuando están alineadas. El epitope de copia múltiple de la presente invención también puede incluir copias múltiples que son copias exactas del mismo epitope.

Los AFME representativos para su uso con los presentes ensayos están descritos en la publicación internacional nº: WO 97/44469. Otros AFME representativos para su uso en la presente memoria incluyen aquéllos denominados como AFME 12, AFME 13 y AFME 13.1. Se entenderá que estos AFME son simplemente representativos y que hay otros epitopes derivados del genoma del VHC que también encontrarán uso con los presentes ensayos y pueden estar incorporados en éstos u otros AFME.

En las figuras 7A a 7F, se muestra la secuencia de ADN y la secuencia aminoacídica correspondiente al AFME 12. La fórmula estructural general del AFME 12 se muestra en la figura 6 y es como sigue: SODh-EI(tipo 1)-E2 HVR consenso (tipo Ia)-E2 HVR consenso (tipos 1 y 2)-c33c corto (tipo 1)-5-1-1(tipo 1)-5-1-1(tipo 3)-5-1-1(tipo 2)-c100(tipo 1)-NS5(tipo 1)-NS5(tipo 1)-núcleo (tipos 1+2)-núcleo(tipos 1+2). Este epitope de copia múltiple incluye la siguiente secuencia de aminoácidos, numerada en relación con el VHC-1 (la numeración de los aminoácidos expuesta a continuación sigue la designación de numeración proporcionada por Choo, *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 88: 2451-2455, en la que el aminoácido nº 1 es la primera metionina codificada por la secuencia codificante de la región del núcleo): los aminoácidos 1-69 de superóxido dismutasa (SOD, usada para aumentar la expresión recombinante de la proteína); los aminoácidos 303 a 320 de la poliproteína de la región E1; los aminoácidos 390 a 410 de la poliproteína, que representan una secuencia consenso para la región hipervariable de VHC-1a E2; los aminoácidos 384 a 414 de la poliproteína de la región E2, que representan una secuencia consenso para las regiones hipervariables E2 de VHC-1 y VHC-2; los aminoácidos 1211-1457 de la poliproteína del VHC-1 que definen la helicasa; tres copias de un epitope de 5-1-1, los aminoácidos 1689-1735, una del VHC-1, una del VHC-3 y una del VHC-2, siendo las copias determinantes antigénicos equivalentes procedentes de tres cepas víricas diferentes del VHC; el polipéptido VHC C100 del VHC-

1, los aminoácidos 1901-1936 de la poliproteína; dos copias exactas de un epitope de la región NS5 del VHC-1, cada una con los aminoácidos 2278 a 2313 de la poliproteína del VHC; y dos copias de tres epitopes de la región del núcleo, dos del VHC-1 y una del VHC-2, siendo las copias determinantes antigénicos equivalentes representados por los aminoácidos 9 a 53 y 64-88 del VHC-1 y 67-84 del VHC-2.

La tabla 2 muestra las posiciones de los aminoácidos de los diversos epitopes del AFME 12 con referencia a las figuras 7A a 7F de la presente memoria. La numeración de las tablas es relativa al VHC-1. Véase, Choo *et al*. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. 88: 2451-2455. Los AFME 13 y 13.1 también comparten la fórmula general especificada anteriormente para el AFME 12, con modificaciones según lo indicado en las tablas 3 y 4, respectivamente.

TABLA 2. AFME 12

#aa del afme	Sitio del extremo 5'	Epitope	#aa del vhc	cepa
1–69*	*Nco*1	SODh		
72–89	*Mlu*I	E1	303–320	1
92–112	*Hind*111	E2 HVRIa consenso	390–410	1
113–143		E2 HVR consenso1+2	384–414	1,2
146–392	*Spe*I	C33c corto	1211–1457	1
395–441	*Sph*I	5–1–1	1689–1735	1
444–490	*Nru*I	5–1–1	1689–1735	3
493–539	*Cla*I	5–1–1	1689–1735	2
542–577	*Ava*I	C100	1901–1936	1
580–615	*Xba*I	NS5	2278–2313	1
618–653	*Bgl*II	NS5	2278–2313	1
654–741	*Nco*I	Epitopes del núcleo	9–53, R47L	1
			64–88	1
			67–84	2
742–829	*Ba*II	Epitopes del núcleo	9–53, R47L	1
			64–88	1
			67–84	2

*La proteína SOD está truncada de manera que el conjugado de detección, un anticuerpo anti–SOD marcado con HRP, no se una al AFME. El epitope del núcleo está mutado para evitar que los anticuerpos contra el núcleo del VHC, usados en la detección, se unan al AFME

TABLA 3. AFME 13

#aa del afme	Sitio del extremo 5'	Epitope	#aa del vhc	cepa
1–156	*Nco*1	SODh mutada (aa 70–72, ALA)		
161–178	*Mlu*I	E1	303–320	1
181–201	*Hind*111	E2 HVRIa consenso	390–410	1
202–232		E2 HVR consenso 1+2	384–414	1,2
235–451		C33c corto	1211–1457	1
454–500	*Hind*III	5–1–1 PImut*	1689–1735	1
503–549	*Nru*I	5–1–1 PImut*	1689–1735	3
552–598	*Cla*I	5–1–1 PImut*	1689–1735	2
601–636	*Ava*I	C100	1901–1936	1
639–674	*Xba*I	NS5	2278–2313	1
677–712	*Bgl*II	NS5	2278–2313	1
713–800		Epitopes del núcleo	9–53, R47L 64–88 67–84	1 1 2
801–888		Epitopes del núcleo	9–53, R47L 64–88 67–84	1 1 2

*Los epitopes 5–1–1 están modificados eliminando los posibles sitios de escisión (CS o CA) a los que se dirige la proteína recombinante NS3/4a. En lugar de CS o CA, se ha cambiado la secuencia a PI. Adicionalmente, la proteína SOD está mutada de manera que el conjugado de detección, un anticuerpo anti–SOD marcado con HRP, no se una al AFME. El epitope del núcleo está mutado para evitar que los anticuerpos contra el núcleo del VHC, usados en la detección, se unan al AFME.

TABLA 4. AFME 13.1

#aa del afme	Sitio del extremo 5'	Epitope	#aa del vhc	cepa
1–86	*Nco*I	SODh mutada (aa 70–72, ALA)		
89–106	*Mlu*I	E1	303–320	1
109–129	*Hind*III	E2 HVR1a consenso	390–410	1
130–160		E2 HVR consenso 1+2	384–414	1,2
163–379		C33C corto	1211–1457	1
382–428	*Hind*III	5–1–1 PImut*	1689–1735	1
431–477	*Nru*I	5–1–1 PImut*	1689–1735	3
480–526	*Cla*I	5–1–1 PImut*	1689–1735	2
529–564	*Ava*I	C100	1901–1936	1
567–602	*Xba*I	NS5	2278–2313	1
605–640	*Bgl*II	NS5	2278–2313	1
641–728		Epitopes del núcleo	9–53, R47L	1
			64–88	1
			67–84	2
729–816		Epitopes del núcleo	9–53, R47L	1
			64–88	1
			67–84	2

*Los epitopes 5–1–1 están modificados eliminando los posibles sitios de escisión (CS o CA) a los que se dirige la proteína recombinante NS3/4a. En lugar de CS o CA, se ha cambiado la secuencia a PI. Adicionalmente, la proteína SOD está mutada de manera que el conjugado de detección, un anticuerpo anti–SOD marcado con HRP, no se una al AFME. El epitope del núcleo está mutado para evitar que los anticuerpos contra el núcleo del VHC, usados en la detección, se unan al AFME.

En un formato de ensayo, la muestra es combinada con el soporte sólido, según lo descrito más adelante. Si se infecta la muestra con VHC, los antígenos del núcleo, así como los anticuerpos del VHC frente a aquellos epitopes presentes sobre el soporte sólido, se unirán a los componentes del soporte sólido. Entonces se añade un anticuerpo anti-núcleo marcado detectablemente. El anticuerpo anti-núcleo marcado está dirigido contra un epitope diferente del anticuerpo anti-núcleo que está unido al soporte sólido. Este anticuerpo anti-núcleo se une al antígeno del núcleo capturado por los anticuerpos anti-núcleo sobre el soporte sólido.

También se añade un antígeno que reacciona con el anticuerpo del VHC capturado de la muestra biológica, siendo el anticuerpo del VHC de la muestra capturado reactivo con el epitope de NS3/4a. Este antígeno es preferiblemente un epitope derivado de la región NS3 de la poliproteína del VHC. Este antígeno se une al anticuerpo del VHC capturado de la muestra. Se conoce un número de antígenos incluyendo tales epitopes, que incluyen, pero que no se limitan a antígenos derivados de las regiones c33c y c100, así como proteínas de fusión que comprenden un epitope NS3, tales como c25. Estos y otros epitopes NS3 son útiles en los presentes ensayos y son conocidos en la técnica, estando descritos en, p.ej., Houghton *et al*., patente estadounidense nº: 5.350.671; Chien *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. (1992) 89: 10011-10015; Chien *et al*., J. *Gastroent. Hepatol*. (1993) 8: S33-39; Chien *et al*., publicación internacional nº:

WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional nº: WO 94/01778; y las solicitudes de patente estadounidenses permitidas de propiedad común con nº de serie 08/403.509 y 08/444.818.

Se añade un segundo anticuerpo marcado, dirigido contra el antígeno anteriormente descrito. Este anticuerpo puede estar dirigido contra cualquier epitope incluido en el antígeno. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar dirigido contra la región NS3 presente en el antígeno. Alternativamente, si el antígeno anterior es expresado como una proteína de fusión, el segundo anticuerpo marcado puede estar dirigido contra la pareja de fusión. Se pueden añadir otros antígenos y anticuerpos al ensayo, particularmente si el soporte sólido incluye un AFME. Estos formatos de ensayo se explican más adelante.

En la figura 2, se representa un ensayo representativo en virtud de la invención. Como se muestra en la figura, el soporte sólido incluye dos anticuerpos monoclonales anti-núcleo, denominados c11-3 y c11-7. Estos anticuerpos están dirigidos contra un epitope encontrado en la región N-terminal de la proteína del núcleo en los aminoácidos 10-53, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1. El soporte sólido también incluye un epitope para NS3/4a. Se añade la muestra biológica al soporte sólido. El antígeno del núcleo de VHC, así como los anticuerpos dirigidos contra el epitope de NS3/4a, ambos presentes en la muestra, se unirán a los reactivos de captura sobre el soporte sólido.

Entonces se añade anticuerpo monoclonal anti-núcleo marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) c11-14, dirigido contra una región C-terminal del núcleo encontrada en las posiciones de los aminoácidos 120-130, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1. Se añade una proteína de fusión, que comprende una secuencia procedente de la SOD humana (SODh) y un epitope procedente de la región c33c, así como un segundo anticuerpo marcado con HRP, dirigido contra la porción de SOD de la proteína de fusión. La fusión de SOD-c33c se unirá al anticuerpo anti-NS3 y el anticuerpo anti-SOD se unirá, a su vez, con la proteína de fusión SOD-c33c. La detección de la etiqueta indica la presencia de infección por VHC.

En la figura 8, se representa otro ensayo representativo en virtud de la invención. La configuración del ensayo de anticuerpos es un ensayo de captura de un sándwich de antígeno-anticuerpo-antígeno usando tanto NS3/4a como AFME 12. El soporte sólido incluye los dos anticuerpos monoclonales anti-núcleo descritos anteriormente, un epitope para NS3/4a, así como un AFME representativo, el AFME 12, que incluye una versión truncada de la SOD humana. Como con el ensayo anterior, se añade una muestra biológica al soporte sólido. El antígeno del núcleo de VHC, así como los anticuerpos dirigidos contra el epitope de NS3/4a y los epitopes del AFME, presentes en la muestra, se unirán a los reactivos de captura sobre el soporte sólido. Se añaden dos antígenos, uno reactivo con los anticuerpos de la muestra que se unen a NS3/4a (según lo descrito anteriormente) y uno reactivo con los anticuerpos de la muestra que se unen al AFME 12. En la figura 8, el antígeno reactivo con el complejo de AFME 12/anticuerpos de la muestra es una fusión entre una molécula de SOD y c22ksΔ47-L44W. El antígeno c22ks procede de la región del núcleo e incluye los aminoácidos Lis_{10} a Ser_{99} de la poliproteína, así como una eliminación de Arg_{47} normalmente presente y una sustitución de Leu por Trp en la posición 44. El conjugado de detección de anticuerpos es el segundo anticuerpo anti-SOD monoclonal marcado con HRP, descrito anteriormente.

Los ensayos de combinación de antígeno/anticuerpo anteriormente descritos son particularmente ventajosos cuando tanto el antígeno del núcleo del VHC como los anticuerpos contra un NS3/4a y/o el núcleo pueden ser detectados por el mismo soporte en el mismo ensayo. Además, según lo descrito anteriormente, se pueden usar en el cóctel de combinación otros epitopes del VHC, tales como fusionados a SOD contra c100, 5-1-1, antígenos de NS5, así como una proteína resultante de un marco de lectura de la región del núcleo de la poliproteína, tal como se describe en la publicación internacional nº: WO 99/63941, para cubrir otros epitopes no estructurales del VHC.

Con el fin de obtener un mayor entendimiento de la invención, a continuación, se proporciona una explicación más detallada relativa a la producción de anticuerpos para su uso en los presentes inmunoanálisis; la producción de polipéptidos para su uso en los inmunoanálisis; y los procedimientos para realizar los inmunoanálisis.

Producción de anticuerpos para su uso en los inmunoanálisis del VHC

Según lo explicado anteriormente, el ensayo utiliza diversos anticuerpos que son unidos a un soporte sólido (p.ej., uno o más anticuerpos anti-núcleo) y que detectan los complejos de antígeno/anticuerpo formados cuando la infección por VHC está presente en la muestra. Estos anticuerpos pueden ser preparaciones de anticuerpos policlonales o monoclonales, antisuero mono-específico, anticuerpos humanos, o pueden ser anticuerpos híbridos o quiméricos, tales como anticuerpos humanizados, anticuerpos alterados, fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos F(ab), fragmentos Fv, anticuerpos de un solo dominio, constructos de fragmentos de anticuerpos diméricos o triméricos, minicuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que se unen al antígeno en cuestión.

Los anticuerpos son producidos usando técnicas conocidas por aquéllos expertos en la técnica y reveladas en, por ejemplo, las patentes estadounidenses nº: 4.011.308; 4.722.890; 4.016.043; 3.876.504; 3.770.380 y 4.372.745. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales son generados mediante la inmunización de un animal adecuado, tal como un ratón, una rata, un conejo, una oveja o una cabra, con un antígeno de interés. Para aumentar la inmunogenicidad, el antígeno puede ser enlazado a un vehículo antes de la inmunización. Tales vehículos son conocidos por aquéllos expertos en la técnica. La inmunización es generalmente realizada mezclando o emulsionando el antígeno en solución salina, preferiblemente, en un adyuvante tal como un adyuvante completo de Freund, e inyectando una mezcla o una emulsión

parenteralmente (generalmente, subcutánea o intramuscularmente). El animal es generalmente inyectado 2-6 semanas después con una o más inyecciones del antígeno en solución salina, preferiblemente, usando adyuvante incompleto de Freund. Los anticuerpos también pueden ser generados mediante la inmunización *in vitro*, usando procedimientos conocidos en la técnica. Luego se obtiene antisuero policlonal del animal inmunizado. Véase, p.ej., Houghton *et al*., patente estadounidense nº: 5.350.671, para una descripción de la producción de anticuerpos policlonales anti-VHC.

Los anticuerpos monoclonales se preparan generalmente usando el procedimiento de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497, o una modificación del mismo. Comúnmente, se inmuniza un ratón o una rata según lo descrito anteriormente. Sin embargo, en lugar de sangrar al animal para extraer suero, se extirpa el bazo (y opcionalmente varios nodos linfáticos de gran tamaño) y se disocia en células simples. Si se desea, las células del bazo pueden ser examinadas (tras la eliminación de las células no específicamente adherentes) mediante la aplicación de una suspensión celular en una placa o pozo revestido con el antígeno. Las células B, que expresan inmunoglobulina unida a la membrana específica para el antígeno, se unirán a la placa y no serán retiradas con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todas las células del bazo disociadas, son entonces inducidas a fusionarse con las células de mieloma para formar hibridomas, y son cultivadas en un medio selectivo (p.ej., hipoxantina, aminopterina, medio de timidina, "HAT"). Los hibridomas resultantes son colocados sobre una placa mediante dilución limitante y son analizados en cuanto a la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno inmunizante (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales seleccionados son entonces cultivados bien *in vitro* (p.ej., en botellas de cultivo tisular o reactores de fibras huecas) o *in vivo* (p.ej., como ascitis en ratones).

En, p.ej., Houghton *et al*., patentes estadounidenses nº: 5.350.671; Chien *et al*., publicación internacional nº: WO 93/00365; solicitudes de patente estadounidenses permitidas de propiedad común con nº de serie 08/403.590 y 08/444.818; y Kashiwakuma *et al*., patente estadounidense nº: 5.871.904, se ha descrito la producción de diversos anticuerpos monoclonales anti-VHC.

Según lo explicado anteriormente, los fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad de reconocer al antígeno de interés también encontrarán uso en los presentes inmunoanálisis. Se conoce un número de fragmentos de anticuerpo en la técnica que comprende sitios de unión a antígenos capaces de mostrar propiedades de unión inmunológica de una molécula de anticuerpo intacta. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpo funcionales mediante la escisión de una región constante, no responsable de la unión a antígenos, de la molécula de anticuerpo, usando, p.ej., pepsina, para producir fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos contendrán dos sitios de unión a antígenos, pero carecerán de una porción de la región constante de cada una de las cadenas pesadas. De manera similar, si se desea, se pueden producir fragmentos Fab, que comprenden un único sitio de unión a antígenos, p.ej., mediante la digestión de anticuerpos policlonales o monoclonales con papaína. También se pueden producir fragmentos funcionales que sólo incluyan las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, usando técnicas estándar tales como la producción recombinante o la escisión proteolítica preferencial de moléculas de inmunoglobulina. Estos fragmentos son conocidos como F_v. Véase, p.ej., Inbar *et al*. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci*. EE.UU. 69: 2659-2662; Hochman *et al*. (1976) *Biochem* 15: 2706-2710; y Ehrlich *et al*. (1980) *Biochem* 19: 4091-4096.

Un polipéptido Fv monocatenario ("Fvm" o "Fvmc") es un heterodímero V_H-V_L unido mediante enlace covalente que es expresado desde una fusión de genes incluyendo genes codificantes de V_H y V_L ligados por un ligador codificante de péptidos. Huston *et al*. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci*. EE.UU. 85: 5879-5883. Se ha descrito un número de procedimientos para distinguir y desarrollar estructuras químicas (ligadores) para cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas agregadas de forma natural, pero separadas químicamente procedentes de una región V de anticuerpo en una molécula de Fvm que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígenos. Véanse, p. ej., las patentes estadounidenses nº: 5.091.513; 5.132.405 y 4.946.778. Las moléculas de Fvm pueden ser producidas usando procedimientos descritos en la técnica. Véase, p.ej., Huston *et al*. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci*. EE.UU. 85: 5879-5883; las patentes estadounidenses nº: 5.091.513; 5.132.405 y 4.946.778. Los criterios de diseño incluyen la determinación de la longitud apropiada para abarcar la distancia entre el terminal C de una cadena y el terminal N de la otra, estando el ligador generalmente formado de pequeños residuos de aminoácidos hidrófilos que no tienden a enrollarse ni a formar estructuras secundarias. Tales procedimientos han sido descritos en la técnica. Véanse p.ej., las patentes estadounidenses nº: 5.091.513; 5.132.405 y 4.946.778. Los ligadores adecuados comprenden generalmente cadenas polipeptídicas de conjuntos alternos de residuos de glicina y serina, y pueden incluir ácido glutámico y residuos de lisina insertados para aumentar la solubilidad.

Los "mini-anticuerpos" o "minicuerpos" también encontrarán uso con la presente invención. Los minicuerpos son cadenas polipeptídicas de Fvm que incluyen dominios de oligomerización en sus terminales C, separados del Fvm por una región bisagra. Pack *et al*. (1992) *Biochem* 31: 1579-1584. El dominio de oligomerización comprende hélices α auto-asociantes, p.ej., cierres de leucina, cuya estabilidad puede ser aumentada mediante más enlaces de disulfuro. El dominio de oligomerización está diseñado para que sea compatible con el plegamiento vectorial a través de una membrana, un procedimiento pensado para facilitar el plegamiento *in vivo* del polipéptido en una proteína de unión funcional. En general, los minicuerpos son producidos usando procedimientos recombinantes conocidos en la técnica. Véase, p.ej., Pack *et al*., (1992) *Biochem* 31: 1579-1584; Cumber *et al*. (1992) *J. Immunology* 149B: 120-126.

Producción de antígenos para su uso en los inmunoanálisis del VHC

Según lo explicado anteriormente, las moléculas de la presente invención se producen, por lo general, recombinantemente. De este modo, los polinucleótidos codificantes de los antígenos del VHC para su uso en la presente invención

pueden ser formados usando técnicas estándar de Biología Molecular. Por ejemplo, se pueden obtener secuencias de polinucleótidos codificantes de las moléculas anteriormente descritas usando procedimientos recombinantes, tales como mediante el rastreo de ADNc y genotecas de células que expresen el gen, o derivando el gen de un vector conocido para que incluya el mismo. Además, se puede aislar el gen deseado directamente de moléculas de ácido nucleico vírico, usando técnicas descritas en la técnica, tales como en Houghton *et al*., patente estadounidense nº: 5.350.671. También se puede producir el gen de interés sintéticamente, en lugar de clonado. Las moléculas pueden ser diseñadas con los codones apropiados para la secuencia en concreto. Entonces se ensambla la secuencia completa desde oligonucleótidos solapantes preparados mediante procedimientos estándar y ensamblados en una secuencia codificante completa. Véase, p.ej., Edge (1981) *Nature* 292: 756; Nambair *et al*. (1984) *Science* 223: 1299; y Jay *et al*., (1984) *J. Biol. Chem*. 259: 6311.

De este modo, se pueden obtener secuencias concretas de nucleótidos desde vectores que albergan las secuencias deseadas, o sintetizarlas completamente o en parte usando diversas técnicas de síntesis de oligonucleótidos conocidas en la técnica, tales como técnicas de mutagénesis de sitio dirigida y de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) según proceda. Véase, p.ej., Sambrook, *supra*. En concreto, un procedimiento para obtener secuencias de nucleótidos que codifiquen las secuencias deseadas es mediante el apareamiento de conjuntos complementarios de oligonucleótidos sintéticos solapantes producidos en un sintetizador de polinucleótidos automático convencional, seguido por la unión con una ADN ligasa apropiada y la amplificación de la secuencia de nucleótidos ligada mediante PVR. Véase, p.ej., Jayaraman *et al*. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. 88: 4084-4088. Adicionalmente, se pueden usar la síntesis dirigida por oligonucleótidos (Jones *et al*., (1986) *Nature* 54: 75-82), la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de regiones de nucleótidos preexistentes (Riechmann *et al*., (1988) *Nature* 332: 323-327 y Verhoeyen *et al*. (1988) *Science* 239: 1534-1536) y el llenado enzimático de oligonucleótidos discontinuos usando ADN polimerasa de T_4 (Queen *et al*., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. 86: 10029-10033) en virtud de la invención para proporcionar moléculas que tengan las capacidades de unión a antígenos alteradas o aumentadas, y/o una inmunogenicidad reducida.

Una vez preparadas o aisladas las secuencias codificantes, tales secuencias pueden ser clonadas en cualquier vector o replicón adecuado. Se conocen numerosos vectores de clonación por parte de aquéllos expertos en la técnica, y la selección de un vector de clonación adecuado es cuestión de elección. Los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagos, transposones, cósmidos, cromosomas o virus que sean capaces de replicarse cuando estén asociados con los elementos de control adecuados.

Entonces se coloca la secuencia codificante bajo el control de los elementos de control adecuados, en función del sistema que se vaya a usar para la expresión. De este modo, la secuencia codificante puede ser colocada bajo el control de un promotor, un sitio de unión al ribosoma (para la expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador, de manera que la secuencia de ADN de interés sea transcrita en ARN por un transformante adecuado. La secuencia codificante puede contener o puede no contener un péptido señal o una secuencia líder que posteriormente pueda ser eliminado por el huésped en el procesamiento postraduccional. Véanse, p.ej., las patentes estadounidenses nº: 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 relativas al crecimiento de la célula huésped. Las secuencias reguladoras son conocidas por aquéllos expertos en la técnica, y los ejemplos incluyen aquéllas que provocan la expresión de un gen para ser activado o desactivado en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. También pueden estar presentes en el vector otros tipos de elementos reguladores. Por ejemplo, se pueden usar en la presente memoria elementos potenciadores para aumentar los niveles de expresión de los constructos. Los ejemplos incluyen el potenciador del gen temprano SV40 (Dijkema *et al*. (1985) *EMBO J*. 4: 761), el potenciador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR, *Long Terminal Repeat*) del virus del Sarcoma de Rous (Gorman *et al*. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. 79: 6777) y elementos derivados del CMV humano (Boshart *et al*. (1985) *Cell* 41: 521), tales como los elementos incluidos en la secuencia del intrón A del CMV (patente estadounidense 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 número elevado de copias y un promotor potente.

Se construye un vector de expresión de manera que la secuencia codificante concreta sea localizada en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas, siendo la colocación y la orientación de la secuencia codificante con respecto a las secuencias control tal que la secuencia codificante sea transcrita bajo el "control" de las secuencias control (es decir, la ARN polimerasa que se une a la molécula de ADN en las secuencias control transcribe la secuencia codificante). Puede ser deseable la modificación de las secuencias codificantes de la molécula de interés para alcanzar este fin. Por ejemplo, en algunos casos, puede ser necesario modificar la secuencia de manera que pueda estar unida a las secuencias control en la orientación apropiada; es decir, para mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden ser ligadas a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector. Alternativamente, la secuencia codificante puede ser clonada directamente en un vector de expresión que ya contenga las secuencias control y un sitio de restricción apropiado.

Según lo explicado anteriormente, también puede ser deseable producir mutantes o análogos del antígeno de interés. Esto es particularmente cierto con NS3/4a. Los procedimientos para hacer esto están descritos en, p.ej., Dasmahapatra *et al*., patente estadounidense nº: 5.843.752 y Zhang *et al*., patente estadounidense nº: 5.990.276. Los mutantes y los análogos de éste, así como otras proteínas del VHC para su uso en los presentes ensayos pueden ser preparados

mediante la eliminación de una porción de la secuencia codificante del polipéptido de interés, mediante la inserción de una secuencia, y/o mediante la sustitución de uno o más nucleótidos en la secuencia. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos, tales como la mutagénesis de sitio dirigida y similares son conocidas por aquéllos expertos en la técnica. Véase, p.ej., Sambrook *et al*., *supra*; Kunkel, T.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. (1985) 82: 448; Geisselsoder *et al*. (1987) *BioTechniques* 5: 786; Zoller y Smith (1983) *Methods Enzymol*. 100: 468; Dalbie-McFarland *et al*. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE.UU. 79: 6409.

Las moléculas pueden se expresadas en una amplia variedad de sistemas, incluyendo sistemas de expresión de insectos, mamíferos, bacterias, virus y levaduras, todos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, los sistemas de expresión de células de insectos, tales como los sistemas de baculovirus, son conocidos por los expertos en la técnica y están descritos en, p.ej., Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin nº: 1555 (1987). Los materiales y los procedimientos para los sistemas de expresión de células de baculovirus/insectos están disponibles comercialmente en forma de equipo en, entre otros, Invitrogen, San Diego, CA, (equipo "MaxBac"). De manera similar, se conocen en la técnica sistemas de expresión de células de bacterias y mamíferos, y se describen en, p.ej., Sambrook *et al*., *supra*. Los sistemas de expresión de levaduras son conocidos en la técnica y se describen en, p.ej., "Yeast Genetic Engineering" (Barr *et al*., eds., 1989) Butterworths, Londres.

También se conoce un número de células huésped apropiadas para su uso con los sistemas anteriores. Por ejemplo, se conocen en la técnica líneas celulares mamíferas, e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles en 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 recién nacido (BHK), células de riñón de mono (COS), células de riñón embriónico humano, células de carcinoma hepatocelular humano (p.ej., Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), así como otras. De manera similar, los huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp*., encontrarán uso con los presentes constructos de expresión. Los huéspedes de levadura útiles en la presente invención incluyen, entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guillerimondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yanowia lipolytica*. Las células de insecto para su uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, entre otros, *Aedes aegypti*, *Autoprapha californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.

Las moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos de interés pueden ser integradas establemente en un genoma de célula huésped o mantenidas en un elemento episómico estable en una célula huésped adecuada usando diversas técnicas de administración de genes conocidas en la técnica. Véase, p.ej., la patente estadounidense nº: 5.399.346.

En función del sistema de expresión y del huésped seleccionado, las moléculas son producidas mediante el cultivo de células huésped transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente en condiciones mediante las cuales la proteína sea expresada. La proteína expresada es entonces aislada de las células huésped y purificada. Si el sistema de expresión segrega la proteína en un medio de crecimiento, el producto puede ser purificado directamente desde el medio. Si ésta no es segregada, puede ser aislada de los lisados celulares. Las condiciones de crecimiento apropiadas y los procedimientos de recuperación pertenecen al alcance de la técnica.

Se ha descrito la producción recombinante de diversos antígenos del VHC. Véanse, p.ej., Houghton *et al*., patente estadounidense nº: 5.350.671; Chien *et al*., *J. Gastroent. Hepatol*. (1993) 8: S33-39; Chien *et al*., Publicación internacional nº: WO 93/00365; Chien, D.Y., Publicación internacional nº: WO 94/01778.

Ensayos de inmunodiagnóstico

Una vez producidos, los anticuerpos anti-núcleo y los antígenos NS3/4a anteriores son colocados sobre un soporte sólido apropiado para su uso en los presentes inmunoanálisis. Un soporte sólido, a los efectos de la invención, puede ser cualquier material que sea una matriz insoluble y que pueda tener una superficie rígida o semi-rígida. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, sustratos tales como nitrocelulosa (p.ej., en forma de membrana o de pozo de microvaloración); polivinilcloruro (p.ej., láminas o pozos de microvaloración); látex de poliestireno (p.ej., perlas o placas de microvaloración); fluoruro de polivinilideno; papel diazotizado, membranas de nailon; perlas activadas, perlas que responden magnéticamente y similares. Los soportes particulares incluyen placas, pellas, discos, capilares, fibras huecas, agujas, clavos, fibras sólidas, perlas de celulosa, perlas de vidrio poroso, geles de sílice, perlas de poliestireno opcionalmente reticulado con divinilbenceno, perlas de copolímero injertado, perlas de poliacrilamida, perlas de látex, perlas de dimetilacrilamida opcionalmente reticulada con *N,N'*-bis-acriloiletilendiamina y partículas de vidrio revestidas con un polímero hidrófobo.

Si se desea, las moléculas por añadir al soporte sólido pueden ser fácilmente funcionalizadas para crear restos de estireno o acrilato, permitiendo así la incorporación de las moléculas en poliestireno, poliacrilato u otros polímeros tales como poliimida, poliacrilamida, polietileno, polivinilo, polidiacetileno, polifenileno-vinileno, polipéptido, polisacárido, polisulfona, polipirrol, poliimidazol, politiofeno, poliéter, epoxis, vidrio de sílice, gel de sílice, siloxano, polifosfato, hidrogel, agarosa, celulosa y similares.

En un contexto, primero se hace reaccionar un soporte sólido con los anticuerpos anti-núcleo de VHC y el epitope de NS3/4a (denominados en conjunto "los componentes de la fase sólida" en la presente memoria), y opcionalmente, uno o más AFME, en condiciones de unión adecuadas tales que las moléculas estén lo suficientemente inmovilizadas en el soporte. Algunas veces, la inmovilización en el soporte puede aumentarse acoplando primero el antígeno y/o el anticuerpo a una proteína con mejores propiedades de unión en fase sólida. Las proteínas de acoplamiento adecuadas incluyen, pero no se limitan a, macromoléculas tales como albúminas de suero incluyendo la albúmina de suero bovino (ASB), la hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina y otras proteínas conocidas por aquéllos 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 aminoácido y similares. Tales moléculas y procedimientos de acoplamiento de estas moléculas con antígenos son conocidos por aquéllos expertos en la técnica. Véase, p.ej., Brinkley, M.A. (1992) *Bioconjugate Chem*. 3: 2-13; Hashida *et al*. (1984) *J. Appl. Biochem*. 6: 56-63; y Anjaneyulu y Staros (1987) *International J. of Peptide and Protein Res*. 30: 117-124.

Tras hacer reaccionar el soporte sólido con los componentes de la fase sólida, se retira cualquier componente de la fase sólida no inmovilizado del soporte mediante lavado y entonces se ponen en contacto los componentes unidos al soporte con una muestra biológica sospechosa de contener anticuerpos y antígenos del VHC (denominados en conjunto "moléculas de ligando" en la presente memoria) en condiciones de unión adecuadas. Tras el lavado para retirar cualquier molécula de ligando no unida, se añade un segundo anticuerpo anti-núcleo, dirigido contra un epitope diferente del anticuerpo anti-núcleo unido al soporte, en condiciones de unión adecuadas. El anticuerpo anti-núcleo añadido incluye una etiqueta detectable, según lo descrito anteriormente, y actúa para unir cualquier antígeno del núcleo que pudiera estar presente en la muestra que haya reaccionado con el anticuerpo anti-núcleo unido al soporte. También se añaden uno o más antígenos que pueden reaccionar con los anticuerpos presentes en la muestra que han reaccionado, a su vez, con el epitope NS3-4a. Según lo explicado anteriormente, el antígeno es comúnmente derivado de la región NS3 de la poliproteína del VHC, y particularmente, de la región c33c del VHC. Véase, Houghton *et al*., patente estadounidense nº: 5.350.671; Chien *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci*. (1989) 89: 10011-10015; publicación internacional nº: WO 93/00365; y la solicitud de patente estadounidense permitida de propiedad común con nº de serie 08/403.590 y 08/444.818, para una descripción de esta región y los epitopes derivados de la misma. También se añade un anticuerpo marcado dirigido contra este antígeno. El anticuerpo se unirá, por tanto, con el antígeno, que ha reaccionado con los anticuerpos NS3 presentes en la muestra. A este efecto, se puede proporcionar convenientemente el epitope c33c como una fusión entre c33c y la superóxido dismutasa humana (SODh), producida recombinantemente, p.ej., mediante procedimientos descritos en Houghton *et al*., patente estadounidense nº: 5.350.671. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la SOD humana son conocidas y se presentan en Hallewell *et al*., patente estadounidense nº: 5.710.033. Por lo tanto, se puede usar un anticuerpo marcado dirigido contra la SOD humana para detectar la presencia de los complejos formados entre el epitope de NS3/4a, cualquier anticuerpo de la muestra que reaccione con este epitope y polipéptidos del VHC que, a su vez, se unen al anticuerpo de la muestra.

Si hay un AFME presente en el soporte sólido, también se pueden añadir al ensayo uno o más antígenos adicionales, reactivos con los anticuerpos procedentes de la muestra biológica que estén unidos a los antígenos presentes en el AFME. Particularmente útil en este contexto, es un antígeno derivado de la región del núcleo del VHC, y más concretamente, del antígeno c22 que incluye los 119 aminoácidos del núcleo N-terminales de la poliproteína del VHC. Un antígeno particular derivado de c22 es c22ksΔ47-L44W que incluye los aminoácidos Lis_{10} a Ser_{99} de la poliproteína, así como una eliminación de Arg_{47} normalmente presente y una sustitución de Leu por Trp en la posición 44. Como con el epitope c33c anteriormente descrito, se puede proporcionar este antígeno como una fusión con la SODh, y se puede usar el mismo anticuerpo marcado, dirigido contra la SOD humana, para detectar la presencia de complejos formados entre los anticuerpos presentes en la muestra y el epitope de NS3/4a y/o el AFME, cuyos complejos también son unidos con los antígenos del VHC (p.ej., c33c y c22).

Más concretamente, se puede usar un procedimiento de ELISA, en el que los pocillos de una placa de microvaloración sean revestidos con los componentes de la fase sólida. Entonces se añade una muestra biológica que contenga o sea sospechosa de contener moléculas de ligando a los pozos revestidos. Tras un período de incubación suficiente para permitir la unión ligando-molécula al componente de la fase sólida inmovilizado, se pueden lavar la placa o las placas para eliminar los restos no unidos, y se añaden una molécula de unión secundaria marcada detectablemente (anticuerpo anti-núcleo marcado), una molécula que contiene el epitope NS3 y un anticuerpo dirigido contra la molécula que contiene el epitope NS3. Se dejan reaccionar estas moléculas con cualquier antígeno y anticuerpo capturados, se lava la placa y se detecta la presencia de anticuerpos marcados usando procedimientos conocidos en la técnica.

Los reactivos del ensayo anteriormente descritos, incluyendo el soporte sólido de inmunoanálisis con anticuerpos y antígenos unidos, así como los anticuerpos y los antígenos por reaccionar con la muestra capturada, pueden ser proporcionados en equipos con las instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, con el fin de realizar los inmunoanálisis según lo descrito anteriormente. El equipo también puede contener, en función del inmunoanálisis concreto que se use, etiquetas adecuadas y otros reactivos y materiales envasados (es decir, tampones de lavado y similares). Los inmunoanálisis estándar, tales como los descritos anteriormente, pueden ser realizados usando estos equipos.

III. **Experimental**

A continuación, se encuentran los ejemplos de las realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos son ofrecidos únicamente a modo ilustrativo, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números usados (p.ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero, obviamente, se debería permitir algún error experimental y desviación.

Ejemplo 1

Inmunoanálisis de combinación de antígeno/anticuerpo del VHC

El presente inmunoanálisis de combinación de antígeno/anticuerpo del VHC fue comparado con otros ensayos para el VHC destinados a medir los límites de detección de la seroconversión y comparar estos límites con aquéllos obtenidos en otros ensayos comercialmente disponibles como se explica a continuación.

A. *Materiales y procedimientos*

Muestras sanguíneas: Se usaron paneles de muestras sanguíneas humanas comercialmente disponibles, p.ej., Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA (BBI); Bioclinical Partners, Franklin, MA (BCP); y North American Biologics, Inc., BocoRatan, FL (NABI). Los días indicados en las tablas 5 y 6 son los días en los que se recogió la sangre de los sujetos.

Anticuerpos monoclonales: Se obtuvieron anticuerpos monoclonales c11-3, c11-7 y c11-14 de Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey. Los anticuerpos c11-3 y c11-7 están dirigidos contra una porción N-terminal del núcleo (aminoácidos 10-53, numerados en relación con la poliproteína VHC1). El anticuerpo monoclonal c11-14 está dirigido contra una porción C-terminal del núcleo (aminoácidos 120-130, numerados en relación con la poliproteína VHC1). Se conjugó el anticuerpo c11-14 con peroxidasa de rábano picante (HRP) usando procedimientos estándar.

El anticuerpo monoclonal 5A-3 es un anticuerpo anti-SOD dirigido contra los aminoácidos 1 a 65 de la SOD y fue elaborado usando técnicas estándar. El anticuerpo fue conjugado con HRP según lo descrito anteriormente.

B. *Antígenos*

El antígeno c33c (266 aminoácidos, aminoácidos 1192 a 1457 de la poliproteína VHC1) fue expresado como un polipéptido de fusión de SOD interno en *E. coli* mediante los procedimientos descritos para la síntesis del antígeno 5-1-1 (Choo, *et al*., *Science* (1989) 244: 359-362). El antígeno recombinante fue purificado según lo descrito en Chien *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci*. (1989) 89: 10011-10015. Véase, también, Houghton *et al*., patente estadounidense nº: 5.350.671, para la producción de protocolos para SOD-c33c.

El epitope de NS3/4a usado en el ensayo es un epitope conformacional que tiene la secuencia especificada en el figura 3.

C. *Formatos de inmunoensayo*

El ensayo Abbott PRISM (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) se encuentra disponible comercialmente y es un ensayo de detección basado en anticuerpos. El ensayo se realizó usando las instrucciones del fabricante.

El sistema de análisis ELISA versión 3.0 de ORTHO HCV (denominado ensayo Ortho 3.0 en la presente memoria, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) es un ensayo de detección basado en anticuerpos. El ensayo fue realizado usando las instrucciones del fabricante.

El ensayo Roche Amplicor (Roche, Pleasant, CA) es un ensayo basado en la PCR disponible comercialmente. El ensayo fue realizado usando las instrucciones del fabricante.

El ensayo Gen-Probe TMA (San Diego, CA) es un ensayo de amplificación mediada por la transcripción comercialmente disponible. El ensayo fue realizado usando las instrucciones del fabricante.

El ensayo para antígenos Ortho (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) es un ensayo de detección basado en antígenos. El ensayo fue realizado usando las instrucciones del fabricante.

El presente inmunoanálisis de combinación antígeno/anticuerpo de VHC fue realizado como se describe a continuación. Se combinaron y se mezclaron bien 4 mg/ml de cada uno de los anticuerpos monoclonales purificados C11-7 y C11-3 en solución salina tamponada con fosfato x1 (PBS), pH 7,4. Se añadieron 90 ng de antígeno recombinante NS3/4a al mismo tampón de revestimiento. Se mezcló la solución durante 30 minutos antes del revestimiento. Se añadieron 200 μl de la solución anterior por pozo a placas de microvaloración de unión de medio Costar de 96 pozos (Corning, Inc.). Se incubaron las placas a 15-30ºC durante 16-24 horas. Se lavaron las placas dos veces con H_2Od,

seguida por 30 μl/pozo de tampón de post-revestimiento (albúmina de suero bovino al 1% (ASB), 1 x PBS) durante 1 hora y 300 μl/pozo de tampón de estabilidad (1 x PBS, ASB al 1%, manitol, polietilenglicol (PEG), gelatina) durante 1 hora. Se aspiraron las placas y se secaron a 4ºC en un liofilizador durante 24 horas. Las placas fueron embolsadas con desecante.

Para realizar el inmunoanálisis de combinación de antígeno/anticuerpo, se añadieron a la placa 100 μl de tampón de lisis ampliado (*N*-laurilsarcosina al 1%; NaCl 0,65 M; 50 mg/ml de IgG de ratón grado técnico (Sigma, St. Louis, MO), ASB al 1% modificada con sulfhidrilo (Bayer), caseína al 0,1%). Se añadieron entonces 100 μl de muestra. Esto fue incubado sobre un agitador a 40ºC durante una hora. Se lavaron las placas seis veces con 1x PBS, Tween-20 al 0,1%, sobre un lavador de placas Ortho. 200 μl de solución de conjugado (c11-14-HRP en dilución 1:75 con 250 ng/ensayo de antígeno c33c-SOD más HRP anti-SOD de ratón en dilución 1:5.000 en diluyente de muestra HCV 3.0 (del sistema de análisis ELISA versión 3.0 ORTHO HCV, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) sin extracto de SOD, todo preparado 30 minutos antes de la adición). Se incubó la solución 45 minutos con agitación a 40ºC. Esto fue lavado seis veces, según lo anterior, y se añadieron 200 μl de solución de sustrato (1 comprimido de OPD/10 ml). El comprimido de OPD contiene diclorhidrato de *o*-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno para el desarrollo del color de la reacción con peroxidasa de rábano picante y está disponible en Sigma, St. Louis, MO. Esto fue incubado 30 minutos a 15-30ºC en la oscuridad. Se detuvo la reacción mediante la adición de 50 ml de H_2SO_4 4N y se leyeron las placas a 492 nm, en relación con la absorbancia a 690 nm como control.

D. *Resultados*

En las tablas 5 y 6, se muestran los resultados de los diversos ensayos, que representan dos experimentos separados realizados sobre muestras sanguíneas expuestas a una infección por VHC según lo indicado. Las zonas sombreadas indican la detección del virus. Según lo mostrado abajo, el ensayo de combinación de antígeno/ anticuerpo de Chiron detectó la seroconversión en todas las muestras, mientras que el resto de los ensayos basados en antígenos y basados en anticuerpos no detectaron la seroconversión en al menos una muestra. En concreto, ninguno de los ensayos basados en anticuerpos detectó la seroconversión hasta al menos el día 18 (tabla 5). La tabla 6 muestra que ninguno de los ensayos basados en anticuerpos detectó la presencia de infección por VHC en el día 22. Además, el ensayo basado en antígenos Ortho no detectó seroconversión del día 85 en adelante.

De este modo, en base a los resultados anteriores, es obvio que el novedoso ensayo de combinación de anticuerpo/antígeno reduce el número de falsos negativos obtenido usando otros ensayos basados en anticuerpos y en antígenos convencionales.

Tabla 5: Seroconversión del VHC

Días	Abbott PRISM	Ortho 3.0	Roche Amplicor	Gen–Probe TMA	Ortho Ag	Chiron Ag/Ac
0	0,1	0,0	>5 x 10^5	9,25	18,6	2,8
4	0,1	0,0	>5 x 10^5	9,29	19,0	3,1
7	0,1	0,0	>5 x 10^5	9,52	22,3	1,5
13	0,3	0,1	>5 x 10^5	9,59	26,2	1,7
18	1,3	0,4	>5 x 10^5	9,70	15,9	1,2
21	2,2	1,0	>5 x 10^5	9,39	11,3	1,5
164	4,2	4,4	4 x 10^4	9,28	0,11	2,5

Tabla 6: Seroconversión del VHC

Días	Abbott PRISM	Ortho 3.0	Roche Amplicor	Gen–Probe TMA	Ortho Ag	Chiron Ag/Ac
0	0,1	0,0	BLD		0,11	0,5
13	0,1	0,0	>5 x 10^5		44,0	3,0
20	0,1	0,0	>5 x 10^5		24,2	1,3
22	0,3	0,0	>5 x 10^5		29,2	1,6
85	5,4	4,7	BQR		0,06	1,1
131	4,3	4,7	BQR		0,09	1,0
135	4,6	4,7	3 x 10^3		0,09	1,2
138	5,5	4,7	BLD		0,08	1,2
146	5,9	4,7	BLD		0,11	2,1
152	5,2	4,7	BQR		0,07	1,8

Ejemplo 2

Producción de un epitope conformacional de NS3/4a con sustituciones de Thr a Pro y Ser a IIe

El epitope conformacional de NS3/4a fue obtenido como se describe a continuación. Este epitope tiene la secuencia especificada en las figuras 4 a 4D, y difiere de la secuencia nativa en las posiciones 403 (aminoácido 1428 de la secuencia de longitud completa del VHC-1) y 404 (aminoácido 1429 de la secuencia de longitud completa del VHC-1). Específicamente, la Thr que ocurre normalmente en la posición 1428 de la secuencia nativa ha sido mutada a Pro y Ser que ocurre en la posición 1429 de la secuencia nativa ha sido mutada a IIe.

En concreto, el vector de expresión de levadura usado fue pBS24.1, descrito anteriormente. El plásmido pd.hcvla.ns3ns4aPI, que codificaba un epitope de NS3/4a representativo usado en los presentes inmunoanálisis, fue producido como se describe a continuación. Se usó un procedimiento de dos etapas. Primero, se ligaron entre sí los siguientes trozos de ADN: (a) oligonucleótidos sintéticos que proporcionarían un sitio de clonación *Hind*III de 5', seguidos por la secuencia ACAAAACAAA, el iniciador ATG, y los codones para VHC1a, comenzando por el aminoácido 1027 y continuando hasta un sitio *Bgl*I en el aminoácidos 1046; (b) un fragmento de restricción *Bgl*I-*Cla*I de 683 bp (codificante de los aminoácidos 1046-1274) desde pAcHLTns3ns4aPI; y (c) un vector pSP72 (Promega, Madison, WI, Banco de genes/Número de acceso del EMBL X65332) que había sido digerido con *Hind*III y *Cla*I, desfosforilado y purificado con gel. El plásmido pAcHLTns3ns4aPI fue derivado de pAcHLT, un vector de expresión de baculovirus comercialmente disponible en BD Pharmingen (San Diego, CA). En concreto, se preparó un vector *Eco*RI-*Pst*l de pAcHLT, así como los siguientes fragmentos: *EcoR*I-*Alwn*l, 935 bp, correspondiente a los aminoácidos 1027-1336 del genoma del VHC-1; *Alwn*l-*Sac*II, 247 bp, correspondiente a los aminoácidos 1336-1419 del genoma del VHC-1; *Hinf*l-*Bgl*l, 175 bp, correspondiente a los aminoácidos 1449-1509 del genoma del VHC-1; *Bgl*I-*Pst*l, 619 bp, correspondiente a los aminoácidos 1510-1711 del genoma del VHC-1, más el codón de terminación de la transcripción. Se ligó un fragmento generado sintéticamente *SacI*-*Hinf*t de 91 bp, correspondiente a los aminoácidos 1420-1448 del genoma del VHC-1 y que contenía las mutaciones de PI (Thr-1428 mutada a Pro; Ser-1429 mutada a IIe) con el fragmento *Hinf*t-*Bgl*I de 175 bp y el fragmento *Bgl*I-*Pst*l de 619 bp descrito anteriormente, y se subclonó en un vector pGEM-5Zf(+) digerido con *Sac*II y *Pst*l. El pGEM-5Zf(+) es un vector de *E. coli* comercialmente disponible (Promega, Madison, WI, Banco de genes/Número de acceso del EMBL X65308). Tras la transformación de células HB101 competentes, un análisis de minimuestreo de clones individuales y la verificación de las secuencias, se purificó con gel un fragmento *SacI*-*Pst*l de 885 bp del clon 2 de Pgem5.PI. Este fragmento fue ligado con el fragmento *Eco*RI-*Alwn*l de 935 bp, el fragmento de 247 bp *Alwn*l-*Sac*II y el vector *Eco*RI-*Pst*l de pAcHLT, descrito anteriormente. La construcción resultante fue denominada pAcHLTns3ns4aPI.

La mezcla de ligación anterior fue transformada en células competentes HB101 y colocada en placas de agar Luria que contenían 100 μg/ml de ampicilina. Los análisis miniprep de los clones individuales condujeron a la identificación de positivos putativos, dos de los cuales fueron amplificados. El ADN de plásmido para pSP72IaHC, los clones #1 y #2 fueron preparados con un equipo Maxiprep de Qiagen y fueron secuenciados.

A continuación, se ligaron entre sí los siguientes fragmentos: (a) un fragmento *Hind*III-*Cla*I de 761 bp de pSP721aHC#1 (el pSP72.1aHC fue generado ligando entre sí lo siguiente: pSP72 que había sido digerido con *Hind*III y *Cla*I, oligonucleótidos sintéticos que proporcionarían un sitio de clonación *Hind*III de 5', seguidos por la secuencia ACAAAACAAA, el codón de inicio ATG y los codones para el VHC1a, comenzando por el aminoácido 1027 y continuando hasta un sitio *Bgl*II en el aminoácido 1046, y un fragmento de restricción *Bgl*II-*Cla*I de 683 bp (codificante de los aminoácidos 1046-1274) de pAcHLTns3ns4aPI); (b) un fragmento *Bam*HI-*Hind*III de 1353 bp par el promotor híbrido de levadura ADH2/GAPDH; (c) un fragmento *Cla*I-*Sal*I de 1320 bp (codificante de los aminoácidos 1046-1711 del VHC1a con Thr 1428 mutada a Pro y Ser 1429 mutada a IIe) de pAcHLTns3ns4aPI; y (d) el vector de expresión de levadura pBS24.1 que había sido digerido con *Bana*HI y *Sal*I, desfosforilado y purificado con gel. La mezcla de ligación fue transformada en HB 101 competentes y colocada en placas agar Luria que contenían 100 μg/ml de ampicilina. Los análisis miniprep de colonias individuales condujeron a la identificación de los clones con el inserto *Bam*HI-*Sal*I de 3446 bp esperado que estaba comprendido por el promotor ADH2/GAPDH, el codón iniciador ATG y NS3/4a del VHC1a de los aminoácidos 1027-1711 (mostrado como los aminoácidos 1-686 de las figuras 4A-AD) con Thr 1428 (posición de aminoácido 403 de las figuras 4A-AD) mutada a Pro y Ser 1429 (posición de aminoácido 404 de las figuras 4A-AD) mutada a IIe. El constructo fue denominado pd.HCVIa.ns3ns4aPI (véase la figura 5).

La cepa AD3 de *S. cerevisiae* fue transformada con pd.HCV1a.ns3ns4aPI y los transformantes simples fueron examinados en cuanto a la expresión tras el agotamiento de la glucosa en el medio. La proteína recombinante fue expresada a niveles elevados en levadura, según lo detectado mediante tinción con azul de Coomassie y confirmado por análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo policlonal contra el dominio de la helicasa de NS3.

Ejemplo 3

Purificación del epitope conformacional de NS3/4a

El epitope conformacional de NS3/4a fue purificado como se describe a continuación. Se cosecharon como se describe anteriormente células de *S. cerevisiae* anteriores, que expresaban el epitope de NS3/4a. Se suspendieron las células en tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 0,1 μM, leupeptina 1 μM) y se lisaron en un Dyno-Mill (Wab Willy A. Bachofon, Basel, Suiza) o un aparato equivalente usando perlas de vidrio a una proporción de células : tampón : perlas de vidrio de 0,5 mm de 1:1:1. Se centrifugó el lisado a 30.100 xg durante 30 min a 4ºC y se añadió una pella que contenía la fracción de proteína insoluble al tampón de lavado (peso inicial de la pella celular de 6 ml/g) y se meció a temperatura ambiente durante 15 min. El tampón de lavado estaba constituido por $NaPO_4$ 50 mM, pH 8,0; NaCl 0,3 M; β-mercaptoetanol 5 mM; glicerol al 10%; octil-glucósido al 0,05%; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM; pepstatina 0,1 μM; leupeptina 1 μM. Se eliminaron los desechos celulares por centrifugación a 30.100 xg durante 30 min a 4ºC. Se descargó el sobrenadante y se conservó la pella.

Se extrajo la proteína de la pella como se describe a continuación. Se añadieron 6 ml/g de tampón de extracción y se medió a temperatura ambiente durante 15 min. El tampón de extracción estaba constituido por Tris 50 mM, pH 8,0; NaCl 1 M; β-mercaptoetanol 5 mM; glicerol al 10%; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM; pepstatina 0,1 μM; leupeptina 1 μM. Se centrifugó esto a 30.100 xg durante 30 minutos a 4ºC. Se conservó el sobrenadante y se añadió sulfato de amonio hasta el 17,5% usando la siguiente fórmula: volumen del sobrenadante (ml) multiplicado por x% de sulfato de amonio/(1 - x% de sulfato de amonio) = ml de sulfato de amonio saturado 4,1 M por añadir al sobrenadante. El sulfato de amonio fue añadido en gotas mientras se agitaba sobre hielo, y la solución fue agitada sobre hielo durante 10 min. Se centrifugó la solución a 17.700 xg durante 30 min a 4ºC y se conservó la pella y se almacenó a 2ºC hasta 8ºC durante hasta 48 horas.

Se volvió a suspender la pella y se dispuso sobre una columna Poly U (Poly U Sepharose 4B, Amersham Pharmacia) a 4ºC según lo siguiente. Se volvió a suspender la pella en 6 ml de tampón de equilibrio por gramo de peso de pella en una Poly U. El tampón de equilibrio estaba constituido por HEPES 25 mM, pH 8,0; NaCl 200 mM; DTT 5 mM (añadido recién hecho); glicerol al 10%; octil-glucósido al 1,2%. Se meció la solución a 4ºC durante 15 min y se centrifugó a 31.000 xg durante 30 min a 4ºC.

Se preparó una columna Poly U (1 ml de resina por cada gramo de peso de pella inicial). El caudal lineal era de 60 cm/h y el caudal de relleno era del 133% de los 60 cm/h. Se equilibró la columna con tampón de equilibrio y se cargó el sobrenadante de la pella de sulfato de amonio resuspendido sobre la columna de equilibrio. Se lavó la columna hasta la línea base con tampón de equilibrio y se eluyó la proteína con una elución por etapas en el siguiente tampón de elución de Poly U: HEPES 25 mM, pH 8,0; NaCl 1M; DTT 5 mM (añadido recién hecho); glicerol al 10%; octil-glucósido 1,2. Se goteó el eluído de la columna sobre SDS-PAGE (teñido con Coomassie) y se congelaron y almacenaron alícuotas a -80ºC. La presencia del epitope de NS3/4a fue confirmada mediante transferencia Western, usando un anticuerpo policlonal dirigido contra el dominio de la proteasa NS3 y un anticuerpo monoclonal contra el epitope 5-1-1 (VHC 4a).

Adicionalmente, se controló la actividad de la enzima proteasa durante la purificación como se describe a continuación. Se diluyeron un péptido NS4A (KKGS-VVIVGRIVLSGKPAIIPKK) y la muestra que contenía el epitope conformacional de NS3/4a en 90 μl de tampón de reacción (Tris 25 mM; pH 7,5; NaCl 0,15 M; EDTA 0,5 mM; glicerol al 10%; n-Dodecil B-D-maltósido 0,05; DTT 5 mM) y se dejaron mezclándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 90 μl de la mezcla a una placa de microvaloración (Costar, Inc., Corning, NY) y se añadieron

10 μl de sustrato de VHC (AnaSpec, Inc., San José CA). Se mezcló la placa y se leyó en un lector de placas Fluostar. Los resultados fueron expresados en unidades de fluorescencia relativa (UFR) por minuto.

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

Ejemplo 4

Estudios de competitividad

El siguiente estudio de competitividad fue realizado con el fin de evaluar si el epitope conformacional de NS3/4a detectaba diferentes anticuerpos que otros antígenos del VHC. En concreto, se comparó el antígeno NS3/4a con el antígeno c200 como se describe a continuación.

Se mezclaron 0,5 μg y 1,0 μg de NS3/4a, producido según lo descrito anteriormente) o c200 (*Hepatology* (1992) 15: 19-25, disponible en el sistema de análisis ELISA versión 3.0 de ORTHO HCV, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) con 20 μl de PHV914-5 de muestra (sangría de seroconversión temprana obtenida de la sangre de un individuo infectado) en un volumen total de 220 μl (1 x PBS). Se incubó la mezcla durante 1 hora en micropozos a 37ºC. Luego se transfirió la mezcla a placas revestidas con NS3-4a y se incubó durante 1 hora a 37ºC. Las placas fueron lavadas y analizadas como se explica a continuación.

Se añadió 1 μg de antígeno c200 a 10 μl de PHV914-5 de muestra en un volumen total de aproximadamente 200 μl. Se incubó la mezcla durante 1 hora en un micropocillo a 37ºC y se transfirieron 200 μl a un placa revestida con NS3/4a (100 ng/ensayo) y se incubó durante 1 hora a 37ºC. Se lavaron las placas cinco veces con 1 x PBS, Tween-20 al 0,1%. Se añadieron 200 μl de solución de conjugado (descrita anteriormente), y se incubaron y analizaron las placas. También se trataron como anteriormente los controles que estaban constituidos por PHV914-5 y 1 x PBS (sin antígeno).

En la tabla 7, se muestran los resultados. Los resultados del porcentaje de inhibición mostrados en la columna 4 se calculan como la columna 3 menos (la columna 2 dividida entre la columna 3 veces 100). Como puede verse, los datos muestran que NS34a es neutralizado por anticuerpos de seroconversión temprana y c200 no lo es. Se alcanzó una señal potente cuando los anticuerpos del miembro del panel de seroconversión temprana de c33c PHV914-5 reaccionaron con el NS34a de revestimiento de la placa. El antígeno c200 no fue neutralizado por estos anticuerpos. Esto se muestra en el panel superior de la tabla 7. Cuando se mezcló NS34a con la muestra de PHV914-5, fue neutralizado, sin que hubiera, de ese modo, anticuerpos presentes en la muestra para reaccionar con el NS34a que revestía la microplaca. Los datos indican que NS34a puede estar detectando una clase diferente de anticuerpos que la detectada por c200.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 7

Estudios de competitividad para demostrar que el antígeno NS34a detecta diferentes anticuerpos en el panel de seroconversión temprana de c33c en comparación con el antígeno c200

1	2	3	4
c200	+	PHV914–5	Control 1 - PBS 2	% de inhibición
		s	s	
1 ug		1,450	1,645	12
1ug		1,545	1,687	8
0,5 ug		1,557	1,913	19
0,5 ug		1,719	1,804	5
NS3/4a	+	PHV914–5		
		s	s	
1 ug		0,054	1,599	97
1ug		0,037	1,677	98
0,5 ug		0,066	1,672	96
0,5 ug		ND	1,524	ND

Ejemplo 5

Estudios de estabilidad del epitope conformacional de NS3/4a

Para evaluar el papel de la estabilidad del epitope de NS3/4a para medir el rendimiento, se realizó el siguiente estudio con el fin de determinar la inmunorreactividad de NS3/4a frente al tiempo a temperatura ambiente. Se dejaron en reposo partes alícuotas pequeñas de NS3/4a madre, y luego se congelaron a intervalos según lo mostrado en la tabla 8. Todos los viales fueron revestidos simultáneamente y analizados frente a dos paneles de seroconversión temprana de NS3.

Como puede verse en la tabla 8, NS3/4a madre no es estable y la inmunorreactividad desciende con el tiempo. Además, es necesario mantener la configuración de NS3/4a para la inmunorreactividad.

Se realizaron más estudios de estabilidad según lo siguiente. Se sustituyeron dos anticuerpos monoclonales conformacionales formados contra NS3/4a usando procedimientos estándar por paneles de seroconversión temprana anti-VHC. Se almacenaron a temperatura ambiente en intervalos de 3, 6 y 24 horas viales de NS3/4a madre. Se revistió el NS3/4a de los viales congelados a 90 ng/ml y se analizó usando el procedimiento descrito anteriormente. Los resultados sugirieron que los dos monoclonales eran realmente conformacionales y su reactividad era sensible al tratamiento del antígeno NS3/4a madre a temperatura ambiente. La reactividad de un anticuerpo monoclonal de control positivo no cambió.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 8

Tiempo (h)	0	6	21,4	29	35,5	46	52	control
	A	D	G	H	I	K	N	Referencia
	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co
PHV 904–1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PHV 904–2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PHV 904–3	1,5	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8
PHV 904–4	3,7	1,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	4,4
PHV 904–5	4,8	2,0	0,7	0,6	0,3	0,2	0,3	5,5
PHV 904–6	5,4	2,8	1,1	1,0	0,6	0,5	0,6	5,8
PHV 904–7	5,1	6,4	1,5	1,0	1,1	0,5	0,7	5,4
PHV 914–1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PHV 914–2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PHV 914–3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PHV 914–4	0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7
PHV 914–5	2,1	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0
PHV 914–6	2,3	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4
PHV 914–7	2,8	0,5	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	4,9
PHV 914–8	2,9	0,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4,9
Enzima								
UFR/min	**8,75**	**4,14**	**3,08**	**1,88**	**1,75**	**1,75**	**0,75**	

Ejemplo 6

Inmunorreactividad del epitope conformacional de NS3/4a frente a NS3/4a desnaturalizado

Se comparó la inmunorreactividad del epitope conformacional de NS3/4a, producido según lo descrito anteriormente, con NS3/4a que había sido desnaturalizado mediante la adición de SDS a la preparación de epitope conformacional de NS3/4a hasta una concentración final del 2%. Se revistieron con el NS3/4a desnaturalizado y el NS3/4a conformacional placas de microvaloración según lo descrito anteriormente. También se revistieron placas de microvaloración con antígeno c200 (*Hepatology* (1992) 15:19-25, disponible en el sistema de análisis ELISA versión 3.0 de ORTHO HCV, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey). Se supone que el antígeno c200 usado como comparación era no conformacional debido a la presencia de agente reductor (DTT) y detergente (SDS) en su formulación.

Se analizó la inmunorreactividad frente a dos paneles de seroconversión temprana del VHC, PHV 904 y PHV 914 (muestras de sangre humana comercialmente disponibles en Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA). En la tabla 9, se muestran los resultados. Los datos sugieren que la forma desnaturalizada y linealizada de NS3/4a (así como c200) no detectan paneles de seroconversión temprana tan pronto como el epitope conformacional de NS3/4a.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 9

	NS3/4a frente a NS3/4a desnaturalizado						
	*SDS al 2% añadido a NS3/4a madre						
		NS3/4a	NS3/4ad*	c200	NS3/4a	NS3/4ad*	c200
		OD	OD	OD	s/co	s/co	s/co
VHC	PHV 904–1	0.012	0.012	0.009	0,02	0.02	0.01
Seroconversiones	PHV 904–2	0.011	0.009	0.008	0,02	0,01	0.01
	PHV 904–3	1.124	0.071	0,045	1,80	0.11	0.07
	PHV 904–4	2.401	0.273	0.129	3,85	0.44	0.21
	PHV 904–5	3.022	0,793	0.347	4,85	1,28	0.57
	PHV 904–6	2.711	1,472	0,774	4,65	2,37	1,28
	PHV 904–7	3.294	1,860	0.943	5,28	2,99	1,55
	PHV 914–1	0.006	0,004	0,001	0.01	0.01	0.00
	PHV 914–2	0.005	0,004	0.002	0.01	0.01	0.00
	PHV 914–3	0.098	0.003	0.001	0.16	0.00	0.00
	PHV 914–4	1,118	0,006	0,004	1,79	0.01	0.01
	PHV 914–5	2,035	0.044	0,022	3,26	0.07	0.04
	PHV 914–6	2.092	0,074	0,025	3,35	0.12	0.04
	PHV 914–7	2.519	0.281	0,132	4,04	0,45	0,22
	PHV 914–8	2.746	0.907	0.500	4,40	1,46	0.82
	PHV 914–9	3.084	1,730	0.931	4,94	2,78	1,53
HCV 3.0	Cont. neg.	0.023	0.024	0.008			
Controles	Cont. neg.	0.027	0,024	0,007			
	Cont. neg	0.021	0.017	0.005			
	Media	0,024	0.022	0.007			
	Corte	0.624	0.622	0.607			
	Cont. pos.	1.239	0.903	0.575	1 99	1,45	0.95
	Cont. pos.	1.445	0.916	0 614	2.32	1.47	1.01

También se analizó la inmunorreactividad del epitope conformacional usando anticuerpos monoclonales contra NS3/4a, fabricados usando procedimientos estándar. Estos anticuerpos monoclonales fueron entonces analizados en el formato ELISA contra NS3/4a y NS3/4a desnaturalizado, y antígeno c200. Los datos muestran que los monoclonales anti-NS3/4a reaccionan contra el NS3/4a y el NS3/4a desnaturalizado de un modo similar a los paneles de seroconversión mostrados en la tabla 10. Este resultado también proporciona más pruebas de que el NS3/4a es conformacional por naturaleza, así como que se pueden fabricar anticuerpos monoclonales que son similares en reactividad a los paneles de seroconversión temprana de c33c.

Tabla 10				
		NS3/4a	NS3/4ad	c200
Monoclonal		OD	OD	OD
4B9/E3	1:100	1,820	0,616	0,369
	1:1.000	1,397	0,380	0,246
	1:10.000	0,864	0,173	0,070
	1:20.000	0,607	0,116	0,085
5B7/D7	1:100	2,885	0,898	0,436
	1:1.000	2,866	0,541	0,267
	1:10.000	1,672	0,215	0,086
	1:20.000	1,053	0,124	0,059
1A8/H2	1:100	1,020	0,169	0,080
	1:1.000	0,921	0,101	0,043
	1:10.000	0,653	0,037	0,013
	1:20.000	0,337	0,027	0,011

REIVINDICACIONES

1. Un soporte sólido para inmunoanálisis que comprende al menos un anticuerpo anti-núcleo del virus de la hepatitis C (VHC) y al menos un epitope de NS3/4a del VHC aislado unidos al mismo.

2. El soporte sólido para inmunoanálisis de la reivindicación 1, que comprende al menos dos anticuerpos anti-núcleo del VHC unidos al mismo.

3. El soporte sólido para inmunoanálisis de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un anticuerpo anti-núcleo está dirigido contra una región N-terminal del antígeno del núcleo del VHC.

4. El soporte sólido para inmunoanálisis de la reivindicación 3, en el que al menos un anticuerpo anti-núcleo está dirigido contra los aminoácidos 10-53 del VHC, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1.

5. El soporte sólido para inmunoanálisis de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un anticuerpo anti-núcleo es un anticuerpo monoclonal.

6. El soporte sólido para inmunoanálisis de la reivindicación 1, en el que dicho epitope de NS3/4a es un epitope conformacional y comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 4A-4D.

7. El soporte sólido para inmunoanálisis de la reivindicación 1, que comprende además un antígeno de fusión de múltiples epitopes unido al mismo.

8. El soporte sólido para inmunoanálisis de la reivindicación 7, en el que dicho antígeno de fusión de múltiples epitopes comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 7A-7F.

9. Un soporte sólido para inmunoanálisis que comprende dos anticuerpos monoclonales anti-núcleo del virus de la hepatitis C (VHC) y un epitope conformacional de NS3/4a del VHC que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 4A-4D, unidos al mismo.

10. El soporte sólido para inmunoanálisis de la reivindicación 9, en el que dichos dos anticuerpos anti-núcleo están dirigidos contra una región N-terminal del antígeno del núcleo del VHC.

11. El soporte sólido para inmunoanálisis de la reivindicación 10, en el que dichos dos anticuerpos anti-núcleo están dirigidos contra los aminoácidos 10-53 del VHC, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1.

12. Un soporte sólido para inmunoanálisis que comprende dos anticuerpos monoclonales anti-núcleo del virus de la hepatitis C (VHC), un epitope conformacional de NS3/4a del VHC que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 4A-4D, y un antígeno de fusión de múltiples epitopes que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 7A-7F, unidos al mismo.

13. Un procedimiento de detección de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:

a) proporcionar un soporte sólido de inmunoanálisis según la reivindicación 1;

b) combinar una muestra biológica con dicho soporte sólido en condiciones que permitan a los antígenos y anticuerpos del VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a dicho al menos un anticuerpo anti-núcleo y a dicho epitope de NS3/4a, respectivamente;

c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos (i) un primer anticuerpo marcado detectablemente, siendo dicho primer anticuerpo marcado detectablemente un anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente, estando dicho anticuerpo anti-núcleo marcado dirigido contra un epitope del núcleo del VHC diferente del al menos un anticuerpo anti-núcleo unido al soporte sólido; (ii) un antígeno que reacciona con un anticuerpo del VHC de la muestra biológica reactivo con dicho epitope de NS3/4a; e (iii) un segundo anticuerpo marcado detectablemente, siendo dicho segundo anticuerpo marcado detectablemente reactivo con el antígeno de (ii);

d) detectar los complejos formados entre los anticuerpos y los antígenos, si los hay, como una indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho al menos un anticuerpo anti-núcleo está dirigido contra una región N-terminal del antígeno del núcleo del VHC y dicho anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente está dirigido contra una región C-terminal del antígeno del núcleo del VHC.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicho al menos un anticuerpo anti-núcleo está dirigido contra los aminoácidos 10-53 del VHC, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1 y dicho anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente está dirigido contra los aminoácidos 120-130 del VHC, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1.

16. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho antígeno que reacciona con un anticuerpo del VHC de la muestra biológica comprende un epitope de la región c33c de la poliproteína del VHC.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el epitope de c33c está fusionado con una secuencia de aminoácidos de la superóxido dismutasa humana (SODh) y el segundo anticuerpo marcado detectablemente es reactivo con dicha secuencia de aminoácidos de la SODh.

18. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho epitope de NS3/4a es un epitope conformacional y comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 4A-4D.

19. Un procedimiento de detección de infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) proporcionar un soporte sólido de inmunoanálisis según la reivindicación 2;

(b) combinar una muestra biológica con dicho soporte sólido en condiciones que permitan a los antígenos y anticuerpos del VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a los dichos al menos dos anticuerpos anti-núcleo y al dicho epitope de NS3/4a, respectivamente;

(c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos (i) un primer anticuerpo marcado detectablemente, siendo dicho primer anticuerpo marcado detectablemente un anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente, estando dicho anticuerpo anti-núcleo marcado dirigido contra un epitope del núcleo del VHC diferente de los al menos dos anticuerpos anti-núcleo unidos al soporte sólido; (ii) un epitope de la región c33c de la poliproteína del VHC fusionado a una secuencia de aminoácidos de la SODh; e (iii) un segundo anticuerpo marcado detectablemente, siendo dicho segundo anticuerpo marcado detectablemente reactivo con dicha secuencia de aminoácidos de la SODh;

(d) detectar los complejos formados entre los anticuerpos y los antígenos, si los hay, como una indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicho epitope de NS3/4a es un epitope conformacional y comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 4A-4D.

21. Un procedimiento de detección de infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) proporcionar un soporte sólido para inmunoanálisis según la reivindicación 9;

(b) combinar una muestra biológica con dicho soporte sólido en condiciones que permitan a los antígenos y anticuerpos del VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a los dichos al menos dos anticuerpos anti-núcleo y a dicho epitope conformacional de NS3/4a, respectivamente;

(c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos (i) un primer anticuerpo marcado detectablemente, siendo dicho primer anticuerpo marcado detectablemente un anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente, estando dicho anticuerpo anti-núcleo marcado dirigido contra un epitope del núcleo del VHC diferente de los al menos dos anticuerpos anti-núcleo unidos al soporte sólido; (ii) un epitope de la región c33c de la poliproteína del VHC fusionado a una secuencia de aminoácidos de la SODh; e (iii) un segundo anticuerpo marcado detectablemente, siendo el segundo anticuerpo marcado detectablemente reactivo con la secuencia de aminoácidos de la SODh;

(d) detectar los complejos formados entre los anticuerpos y los antígenos, si los hay, como una indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dichos al menos dos anticuerpos anti-núcleo están dirigidos contra una región N-terminal del antígeno del núcleo del VHC y dicho anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente está dirigido contra una región C-terminal del antígeno del núcleo del VHC.

23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que dichos al menos dos anticuerpos anti-núcleo están dirigido contra los aminoácidos 10-53 del VHC, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1 y dicho anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente está dirigido contra los aminoácidos 120-130 del VHC, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1.

24. Un procedimiento de detección de infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) proporcionar un soporte sólido para inmunoanálisis según la reivindicación 7;

(b) combinar una muestra biológica con dicho soporte sólido en condiciones que permitan a los antígenos y anticuerpos del VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a dicho al menos un anticuerpo anti-núcleo, a dicho epitope de NS3/4a y a dicho antígeno de fusión de múltiples epitopes;

(c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos (i) un primer anticuerpo marcado detectablemente, siendo dicho primer anticuerpo marcado detectablemente un anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente, estando dicho anticuerpo anti-núcleo marcado dirigido contra un epitope del núcleo del VHC diferente del al menos un anticuerpo anti-núcleo unido al soporte sólido; (ii) un primer y un segundo antígeno que reaccionen con un anticuerpo del VHC de la muestra biológica reactivo con dicho epitope de NS3/4a y dicho antígeno de fusión de múltiples epitopes, respectivamente; e (iii) un segundo anticuerpo marcado detectablemente, siendo el segundo anticuerpo marcado detectablemente reactivo con los antígenos de (ii);

(d) detectar los complejos formados entre los anticuerpos y los antígenos, si los hay, como una indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que dicho al menos un anticuerpo anti-núcleo está dirigido contra una región N-terminal del antígeno del núcleo del VHC y dicho primer anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente está dirigido contra una región C-terminal del antígeno del núcleo del VHC.

26. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que dicho al menos un anticuerpo anti-núcleo está dirigido contra los aminoácidos 10-53 del VHC, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1 y dicho anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente está dirigido contra los aminoácidos 120-130 del VHC, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1.

27. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que dicho primer antígeno que reacciona con un anticuerpo del VHC de la muestra biológica comprende un epitope de la región c33c de la poliproteína del VHC.

28. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que el epitope de c33c está fusionado con una secuencia de aminoácidos de la superóxido dismutasa humana (SODh), y el segundo anticuerpo marcado detectablemente es reactivo con dicha secuencia de aminoácidos de la SODh.

29. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que dicho segundo antígeno que reacciona con un anticuerpo del VHC de la muestra biológica comprende un epitope de la región c22 de la poliproteína del VCH.

30. El procedimiento de la reivindicación 29, en el que el epitope de la región c22 comprende los aminoácidos Lis_{10} a Ser_{99} de la poliproteína del VHC, con una eliminación de Arg_{47} y una sustitución de Leu por Trp en la posición 44, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1, estando dicho epitope fusionado con una secuencia de aminoácidos de la superóxido dismutasa humana (SODh) y siendo el segundo anticuerpo marcado detectablemente reactivo con dicha secuencia de aminoácidos de la SODh.

31. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que dicho antígeno de fusión de múltiples epitopes comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 7A-7F.

32. Un procedimiento de detección de infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) proporcionar un soporte sólido para inmunoanálisis según la reivindicación 12;

(b) combinar una muestra biológica con dicho soporte sólido en condiciones que permitan a los antígenos y anticuerpos del VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a los dichos al menos dos anticuerpos anti-núcleo, a dicho epitope conformacional de NS3/4a y a dicho antígeno de fusión de múltiples epitopes, respectivamente;

(c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones de formación de complejos (i) un primer anticuerpo marcado detectablemente, siendo dicho primer anticuerpo marcado detectablemente un anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente, estando dicho anticuerpo anti-núcleo marcado dirigido contra un epitope del núcleo del VHC diferente de los al menos dos anticuerpos anti-núcleo unidos al soporte sólido; (ii) un epitope de la región c33c de la poliproteína del VHC fusionado a una secuencia de aminoácidos de la SODh y un epitope de la región c22 de la poliproteína del VHC fusionado a una secuencia de aminoácidos de la SODh; e (iii) un segundo anticuerpo marcado detectablemente, siendo dicho segundo anticuerpo marcado detectablemente reactivo con dicha secuencia de aminoácidos de la SODh;

(d) detectar los complejos formados entre los anticuerpos y los antígenos, si los hay, como una indicación de la infección por VHC en la muestra biológica.

33. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que dichos al menos dos anticuerpos anti-núcleo están dirigidos contra una región N-terminal del antígeno del núcleo del VHC y dicho anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente está dirigido contra una región C-terminal del antígeno del núcleo del VHC.

34. El procedimiento de la reivindicación 33, en el que dichos al menos dos anticuerpos anti-núcleo están dirigidos contra los aminoácidos 10-53 del VHC, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1 y dicho anticuerpo anti-núcleo del VHC marcado detectablemente está dirigido contra los aminoácidos 120-130 del VHC, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1.

35. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que el epitope de la región c22 comprende los aminoácidos Lis_{10} a Ser_{99} de la poliproteína del VHC, con una eliminación de Arg_{47} y una sustitución de Leu por Trp en la posición 44, numerados en relación con la secuencia de la poliproteína VHC1.

36. Un equipo de prueba de inmunodiagnóstico que comprende el soporte sólido para inmunoanálisis de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y las instrucciones para realizar la prueba de inmunodiagnóstico.

37. Un procedimiento de producción de un soporte sólido para inmunoanálisis que comprende:

(a) proporcionar un soporte sólido; y

(b) unir al menos un anticuerpo anti-núcleo del virus de la hepatitis C (VHC) y al menos un epitope conformacional de NS3/4a del VHC aislado al mismo.

38. Un procedimiento de producción de un soporte sólido para inmunoanálisis que comprende:

(a) proporcionar un soporte sólido; y

(b) unir dos anticuerpos anti-núcleo del virus de la hepatitis C (VHC) y un epitope conformacional de NS3/4a del VHC aislado al mismo.

39. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 38 ó 39, que comprende además unir al menos un antígeno de fusión de múltiples epitopes al soporte sólido.

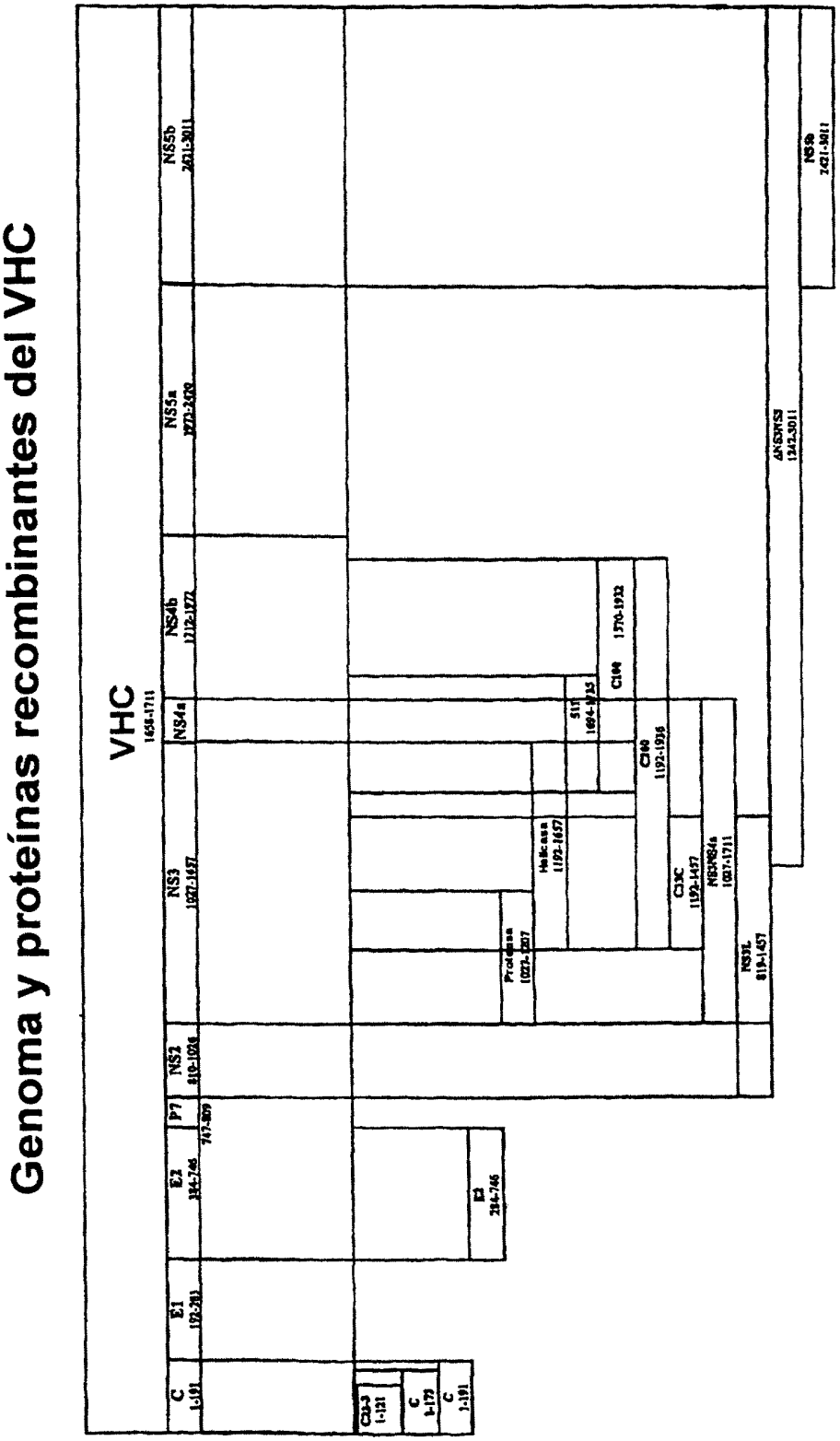

Genoma y proteínas recombinantes del VHC
VHC
1658-1711
C
1-191
E1
192-383
E2
384-746
P7
747-809
NS2
810-1026
NS3
1027-1657
NS4a
1658-1711
NS4b
1712-1972
NS5a
1973-2420
NS5b
2421-3011
C1b-3
1-131
C
1-173
C
1-191
E2
384-746
Proteasa
1027-1207
Helicasa
1192-1657
NS3L
819-1457
C1C
1192-1457
NS3NS4a
1027-1711
C1a
1192-1936
C1a
1570-1932
ΔNS5NS3
1343-3011
NS5b
2421-3011

FIG 1.

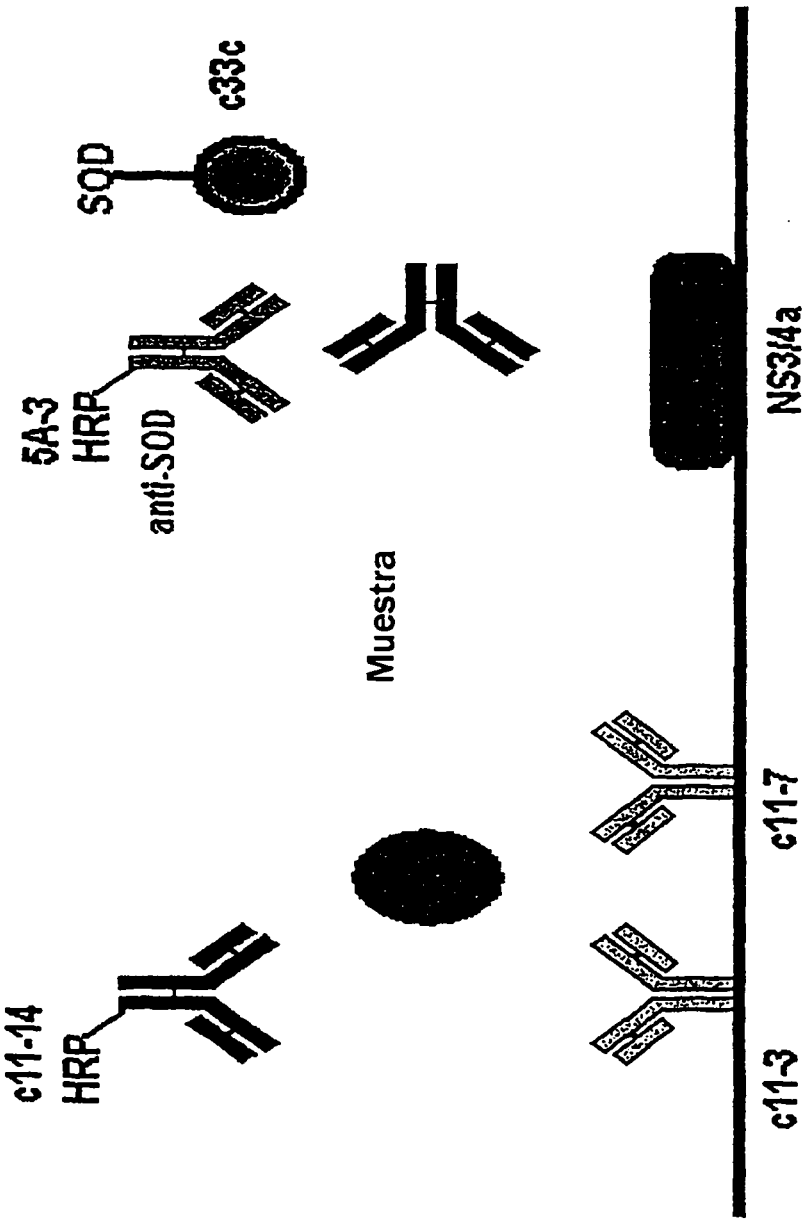


FIG. 2

```
MSPIDPMGHWHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSIEEFAPITAYAQQTRGLLGCIITSLTGRDKNQVE  73
GEVQIVSTAAQTFLATCINGVCWTVYHGAGTRTIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPASQGTRSLTPCTCGSSD 146
LYLVTRHADVIPVRRRGDSRGSLLSPRPISYLKGSAGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVENLE 219
TTMRSPVFTDNSSPPVVPQSFQVAHLHAPTGSGKSTKVPAAYAAQGYKVLVLNPSVAATLGFGAYMSKAHGID 292
PNIRTGVRTITTGSPITYSTYGKFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDATSILGIGTVLDQAETAGARLVVLAT 365
ATPPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEIPFYGKAIPLEVIKGGRHLIFCHSKKKCDELAAKLVALGINAVAYYRGL 438
DVSVIPTIGDVVVVATDALMTGYTGDFDSVIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETITLPQDAVSRTQRRGRTGRG 511
KPGIYRFVAPGERPSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAETTVRLRAYMNTPGLPVCQDHLEFWEGVFTGLTH 584
IDAHFLSQTKQSGENLPYLVAYQATVCARAQAPPPSWDQMWKCLIRLKPTLHGPTPLLYRLGAVQNEITLTHP 657
VTKYIMTCMSADLEVVTSTWVLVGGVLAALAAYCLSTGCVVIVGRVVLSGKPAIIPDREVLYREFDEMEEC   728
```

FIG.3

```
                          1                                        10
                          M   A   P   I   T   A   Y   A   Q   Q
                         ATG GCG CCC ATC ACG GCG TAC GCC CAG CAG

                                                  20
 T   R   G   L   L   G   C   I   I   T   S   L   T   G   R
ACA AGG GGC CTC CTA GGG TGC ATA ATC ACC AGC CTA ACT GGC CGG

                      30                                       40
 D   K   N   Q   V   E   G   E   V   Q   I   V   S   T   A
GAC AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG ATT GTG TCA ACT GCT

                                              50
 A   Q   T   F   L   A   T   C   I   N   G   V   C   W   T
GCC CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGG GTG TGC TGG ACT

                      60                                       70
 V   Y   H   G   A   G   T   R   T   I   A   S   P   K   G
GTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT

                                              80
 P   V   I   Q   M   Y   T   N   V   D   Q   D   L   V   G
CCT GTC ATC CAG ATG TAT ACC AAT GTA GAC CAA GAC CTT GTG GGC

                      90                                      100
 W   P   A   P   Q   G   S   R   S   L   T   P   C   T   C
TGG CCC GCT CCG CAA GGT AGC CGA TCA TTG ACA CCC TGC ACT TGC

                                             110
 G   S   S   D   L   Y   L   V   T   R   H   A   D   V   I
GGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT

                     120                                      130
 P   V   R   R   R   G   D   S   R   G   S   L   L   S   P
CCC GTG CGC CGG CGG GGT GAT AGC AGG GGC AGC CTG CTG TCG CCC

                                             140
 R   P   I   S   Y   L   K   G   S   S   G   G   P   L   L
CGG CCC ATT TCC TAC TTG AAA GGC TCC TCG GGG GGT CCG CTG TTG

                     150                                      160
 C   P   A   G   H   A   V   G   I   F   R   A   A   V   C
TGC CCC GCG GGG CAC GCC GTG GGC ATA TTT AGG GCC GCG GTG TGC

                                             170
 T   R   G   V   A   K   A   V   D   F   I   P   V   E   N
ACC CGT GGA GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC

                     180                                      190
 L   E   T   T   M   R   S   P   V   F   T   D   N   S   S
CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT
```

FIG. 4A

```
                                                200
 P   P   V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A
CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT

                210                                     220
 P   T   G   S   G   K   S   T   K   V   P   A   A   Y   A
CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA

                                                230
 A   Q   G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A
GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA

                240                                     250
 T   L   G   F   G   A   Y   M   S   K   A   H   G   I   D
ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT

                                                260
 P   N   I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P
CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC

                270                                     280
 I   T   Y   S   T   Y   G   K   F   L   A   D   G   G   C
ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC

                                                290
 S   G   G   A   Y   D   I   I   I   C   D   E   C   H   S
TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC

                300                                     310
 T   D   A   T   S   I   L   G   I   G   T   V   L   D   Q
ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA

                                                320
 A   E   T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T
GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC

                330                                     340
 P   P   G   S   V   T   V   P   H   P   N   I   E   E   V
CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT

                                                350
 A   L   S   T   T   G   E   I   P   F   Y   G   K   A   I
GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC

                360                                     370
 P   L   E   V   I   K   G   G   R   H   L   I   F   C   H
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT

                                                380
 S   K   K   K   C   D   E   L   A   A   K   L   V   A   L
TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG
```

FIG. 4B

```
                    390                                                 400
 G   I   N   A   V   A   Y   Y   R   G   L   D   V   S   V
GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC

                                    410
 I   P   P   I   G   D   V   V   V   V   A   T   D   A   L
ATC CCG CCC ATC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC

                    420                                                 430
 M   T   G   Y   T   G   D   F   D   S   V   I   D   C   N
ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT

                                    440
 T   C   V   T   Q   T   V   D   F   S   L   D   P   T   F
ACG TGT GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC

                    450                                                 460
 T   I   E   T   I   T   L   P   Q   D   A   V   S   R   T
ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT

                                    470
 Q   R   R   G   R   T   G   R   G   K   P   G   I   Y   R
CAA CGT CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA

                    480                                                 490
 F   V   A   P   G   E   R   P   S   G   M   F   D   S   S
TTT GTG GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC

                                    500
 V   L   C   E   C   Y   D   A   G   C   A   W   Y   E   L
GTC CTC TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC

                    510                                                 520
 T   P   A   E   T   T   V   R   L   R   A   Y   M   N   T
ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC

                                    530
 P   G   L   P   V   C   Q   D   H   L   E   F   W   E   G
CCG GGG CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC

                    540                                                 550
 V   F   T   G   L   T   H   I   D   A   H   F   L   S   Q
GTC TTT ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG

                                    560
 T   K   Q   S   G   E   N   L   P   Y   L   V   A   Y   Q
ACA AAG CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA

                    570                                                 580
 A   T   V   C   A   R   A   Q   A   P   P   P   S   W   D
GCC ACC GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC
```

FIG. 4C

```
                                                590
 Q   M   W   K   C   L   I   R   L   K   P   T   L   H   G
CAG ATG TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG

                    600                                 610
 P   T   P   L   L   Y   R   L   G   A   V   Q   N   E   I
CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC


                                                620
 T   L   T   H   P   V   T   K   Y   I   M   T   C   M   S
ACC CTG ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG

                    630                                 640
 A   D   L   E   V   V   T   S   T   W   V   L   V   G   G
GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG GTG CTC GTT GGC GGC

                                                650
 V   L   A   A   L   A   A   Y   C   L   S   T   G   C   V
GTC CTG GCT GCT TTG GCC GCG TAT TGC CTG TCA ACA GGC TGC GTG

                    660                                 670
 V   I   V   G   R   V   V   L   S   G   K   P   A   I   I
GTC ATA GTG GGC AGG GTC GTC TTG TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA

                                                680
 P   D   R   E   V   L   Y   R   E   F   D   E   M   E   E
CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG

686
 C
TGC
```

FIG. 4D

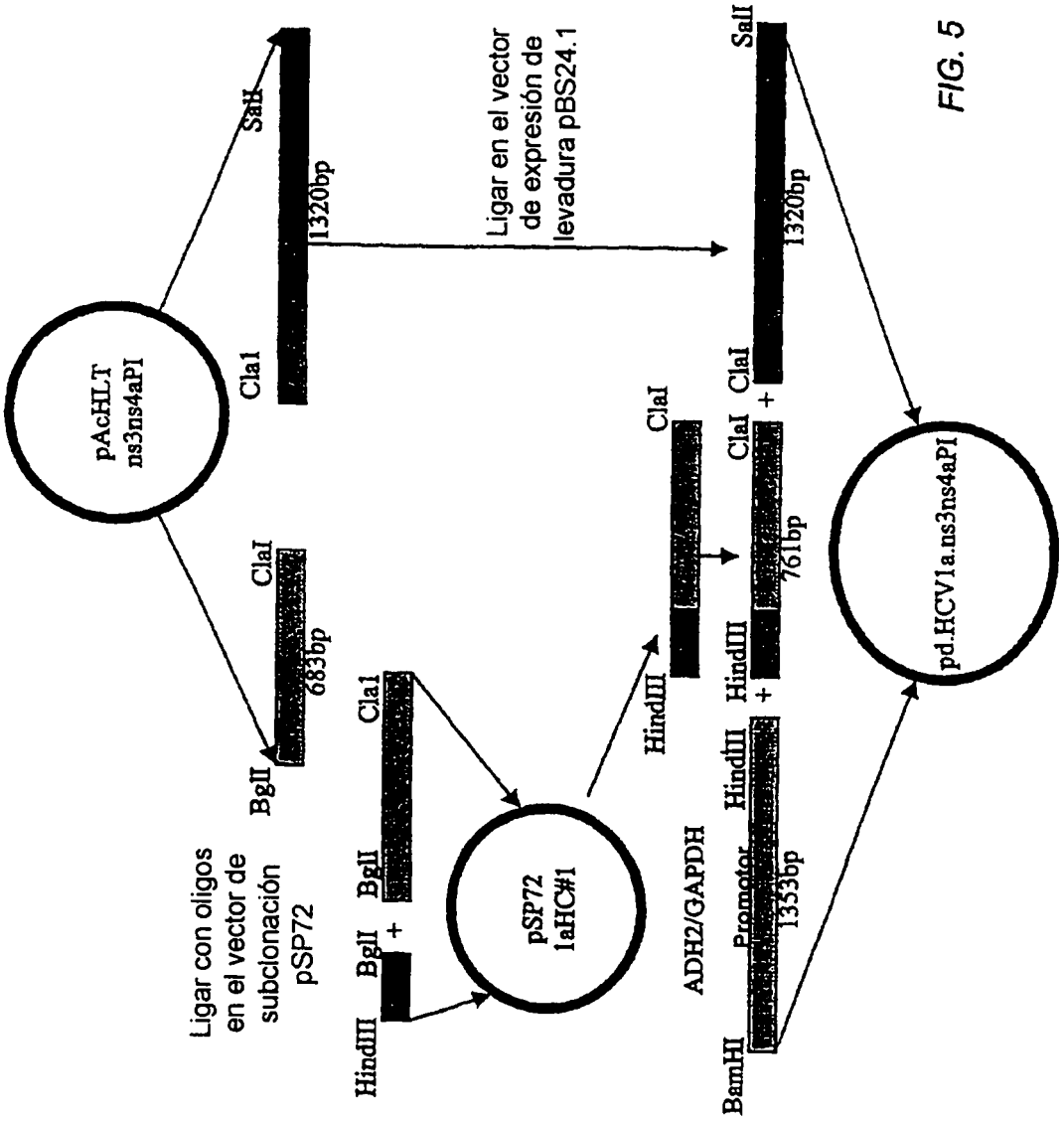

pAcHLT
ns3ns4aPI
SalI
ClaI
1320bp
Ligar en el vector
de expresión de
levadura pBS24.1
SalI
ClaI
1320bp
ClaI
683bp
BglII
Ligar con oligos
en el vector de
subclonación
pSP72
ClaI
BglII
BglII
+
HindIII
pSP72
1aHC#1
HindIII
ClaI
ClaI
+
761bp
HindIII
+
ADH2/GAPDH
Promotor
HindIII
1353bp
BamHI
pd.HCV1a.ns3ns4aPI

FIG. 5

FIG. 5

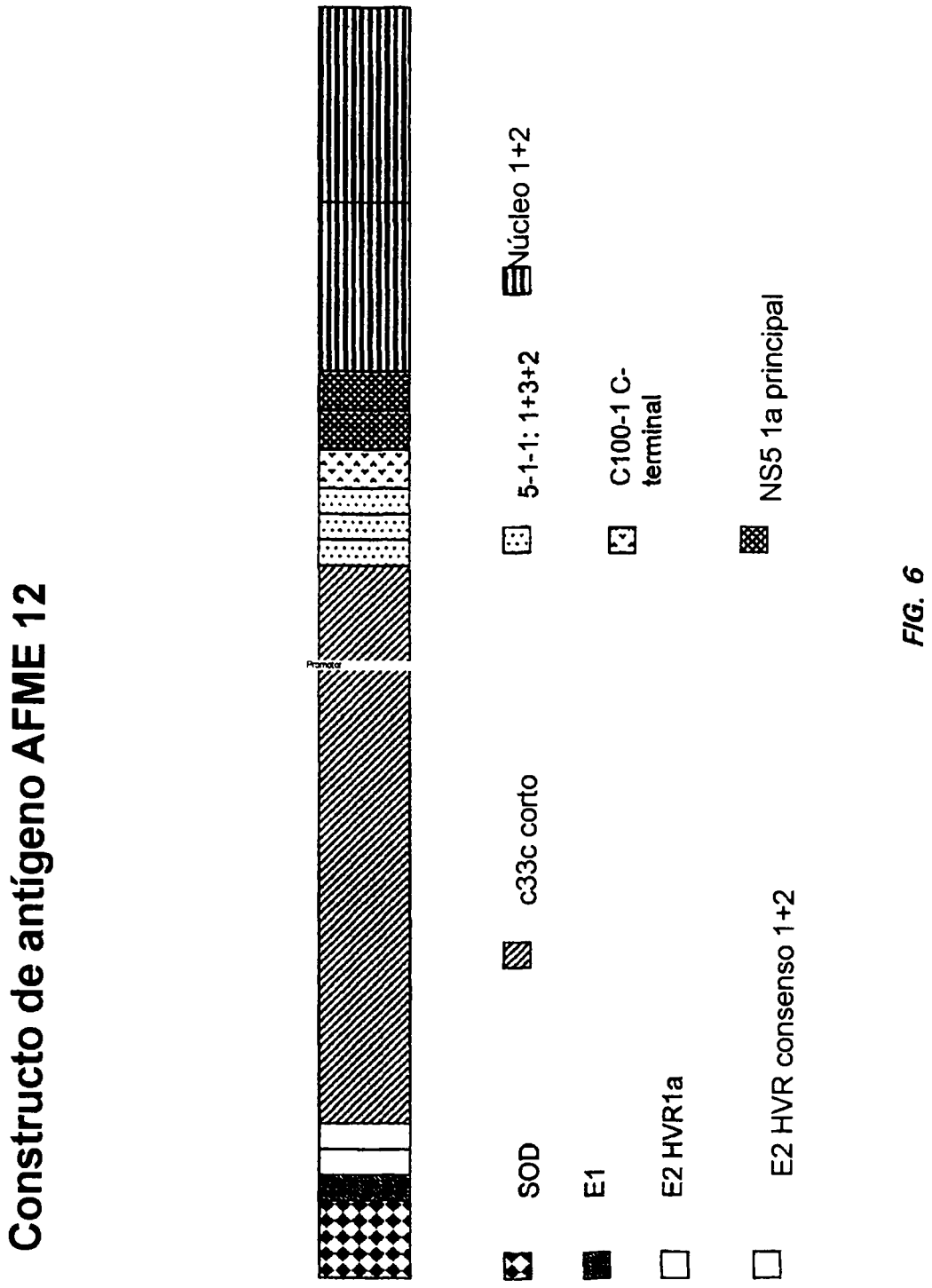

Constructo de antígeno AFME 12
Promotor
SOD
c33c corto
E1
E2 HVR1a
E2 HVR consenso 1+2
5-1-1: 1+3+2
Núcleo 1+2
C100-1 C-terminal
NS5 1a principal

FIG. 6

FIG. 6

```
  1                                                  10
  M   A   T   K   A   V   C   V   L   K   G   D   G   P   V
ATG GCT ACA AAG GCT GTT TGT GTT TTG AAG GGT GAC GGC CCA GTT  45

                  20                                      30
  Q   G   I   I   N   F   E   Q   K   E   S   N   G   P   V
CAA GGT ATT ATT AAC TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG  90

                                      40
  K   V   W   G   S   I   K   G   L   T   E   G   L   H   G
AAG GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA 135

                  50                                      60
  F   H   V   H   E   F   G   D   N   T   A   G   C   T   S
TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT 180

                                      70
  A   G   P   H   F   N   P   L   S   T   R   G   C   N   C
GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC ACG CGT GGT TGC AAT TGC 225

                  80                                      90
  S   I   Y   P   G   H   I   T   G   H   R   M   A   W   K
TCT ATC TAT CCC GGC CAT ATA ACG GGT CAC CGC ATG GCA TGG AAG 270

                                     100
  L   G   S   A   A   R   T   T   S   G   F   V   S   L   F
CTT GGT TCC GCC GCC AGA ACT ACC TCG GGC TTT GTC TCC TTG TTC 315

                 110                                     120
  A   P   G   A   K   Q   N   E   T   H   V   T   G   G   A
GCC CCA GGT GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA 360

                                     130
  A   A   R   T   T   S   G   L   T   S   L   F   S   P   G
GCC GCC CGA ACT ACG TCT GGG TTG ACC TCT TTG TTC TCC CCA GGT 405
```

FIG. 7A

```
                  140                                                 150
 A   S   Q   N   I   Q   L   I   T   S   T   D   N   S   S
GCC AGC CAA AAC ATT CAA TTG ATT ACT AGT ACG GAT AAC TCC TCT  450

                                      160
 P   P   V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A
CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT  495

                  170                                                 180
 P   T   G   S   G   K   S   T   K   V   P   A   A   Y   A
CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA  540

                                      190
 A   Q   G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A
GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA  585

                  200                                                 210
 T   L   G   F   G   A   Y   M   S   K   A   H   G   I   D
ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT  630

                                      220
 P   N   I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P
CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC  675

                  230                                                 240
 I   T   Y   S   T   Y   G   K   F   L   A   D   G   G   C
ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC  720

                                      250
 S   G   G   A   Y   D   I   I   I   C   D   E   C   H   S
TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC  765

                  260                                                 270
 T   D   A   T   S   I   L   G   I   G   T   V   L   D   Q
ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATC GGC ACT GTC CTT GAC CAA  810

                                      280
 A   E   T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T
GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC  855

                  290                                                 300
 P   P   G   S   V   T   V   P   H   P   N   I   E   E   V
CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT  900
```

FIG. 7B

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

                320                                       330
 P   L   E   V   I   K   G   G   R   H   L   I   F   C   H
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT  990

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

                350                                       360
 G   I   N   A   V   A   Y   Y   R   G   L   D   V   S   V
GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC 1080

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

                380                                       390
 M   T   G   Y   T   G   D   F   D   S   V   I   D   C   N
ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT 1170

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

                410                                       420
 V   L   Y   R   E   F   D   E   M   E   E   C   S   Q   H
GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG TGC TCT CAG CAC 1260

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

                440                                       450
 Q   K   A   L   G   L   S   R   G   G   K   P   A   I   V
CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG CCG GCA ATC GTT 1350

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

FIG. 7C

```
                  470                                                 480
 C   S   Q   A   A   P   Y   I   E   Q   A   Q   V   I   A
TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT CAG GTA ATA GCT  1440

                                      490
 H   Q   F   K   E   K   V   L   G   L   I   D   N   D   Q
CAC CAG TTC AAG GAA AAA GTC CTT GGA TTG ATC GAT AAT GAT CAA  1485

                  500                                                 510
 V   V   V   T   P   D   K   E   I   L   Y   E   A   F   D
GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT GAG GCC TTT GAT  1530

                                      520
 E   M   E   E   C   A   S   K   A   A   L   I   E   E   G
GAG ATG GAA GAA TGC GCC TCC AAA GCC GCC CTC ATT GAG GAA GGG  1575

                  530                                                 540
 Q   R   M   A   E   M   L   K   S   K   I   Q   G   L   L
CAG CGG ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA CAA GGC CTC CTC  1625

                                      550
 G   I   L   R   R   H   V   G   P   G   E   G   A   V   Q
GGG ATA CTG CGC CGG CAC GTT GGT CCT GGC GAG GGG GCA GTG CAG  1670

                  560                                                 570
 W   M   N   R   L   I   A   F   A   S   R   G   N   H   V
TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCC TTC GCC TCC AGA GGG AAC CAT GTT  1715

                                      580
 S   P   T   H   Y   V   P   S   R   S   R   R   F   A   Q
TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CGG AGA TTC GCC CAG  1760

                  590                                                 600
 A   L   P   V   W   A   R   P   D   Y   N   P   P   L   V
GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG  1805

                                      610
 E   T   W   K   K   P   D   Y   E   P   P   V   V   H   G
GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAC GGC  1850

                  620                                                 630
 R   S   S   R   R   F   A   Q   A   L   P   V   W   A   R
AGA TCT TCT CGG AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG  1895
```

FIG. 7D

```
                                                  640
 P   D   Y   N   P   P   L   V   E   T   W   K   K   P   D
CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC  1940

                650                                   660
 Y   E   P   P   V   V   H   G   R   K   T   K   R   N   T
TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC  1985

                                                  670
 N   R   R   P   Q   D   V   K   F   P   G   G   G   Q   I
AAC CGG CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC  2030

                680                                   690
 V   G   G   V   Y   L   L   P   R   R   G   P   R   L   G
GTT GGT GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGA TTG GGT  2075

                                                  700
 V   L   A   T   R   K   T   S   P   I   P   K   A   R   R
GTG CTC GCG ACG AGA AAG ACT TCC CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG  2120

                710                                   720
 P   E   G   R   T   W   A   Q   P   G   Y   P   W   P   L
CCC GAG GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC  2165

                                                  730
 Y   G   N   K   D   R   R   S   T   G   K   S   W   G   K
TAT GGC AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG GGT AAG  2210

                740                                   750
 P   G   Y   P   W   P   R   K   T   K   R   N   T   N   R
CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC AAC CGG  2255

                                                  760
 R   P   Q   D   V   K   F   P   G   G   G   Q   I   V   G
CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC GTT GGT  2300

                770                                   780
 G   V   Y   L   L   P   R   R   G   P   R   L   G   V   L
GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGA TTG GGT GTG CTC  2345

                                                  790
 A   T   R   K   T   S   P   I   P   K   A   R   R   P   E
GCG ACG AGA AAG ACT TCC CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG CCC GAG  2390
```

FIG. 7E

```
                  800                                                 810
 G   R   T   W   A   Q   P   G   Y   P   W   P   L   Y   G
GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC  2435

                                      820
 N   K   D   R   R   S   T   G   K   S   W   G   K   P   G
AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG GGT AAG CCA GGG  2480

              829
 Y   P   W   P   OC
TAC CCT TGG CCC TAA TGAGTCGAC
```

FIG. 7F

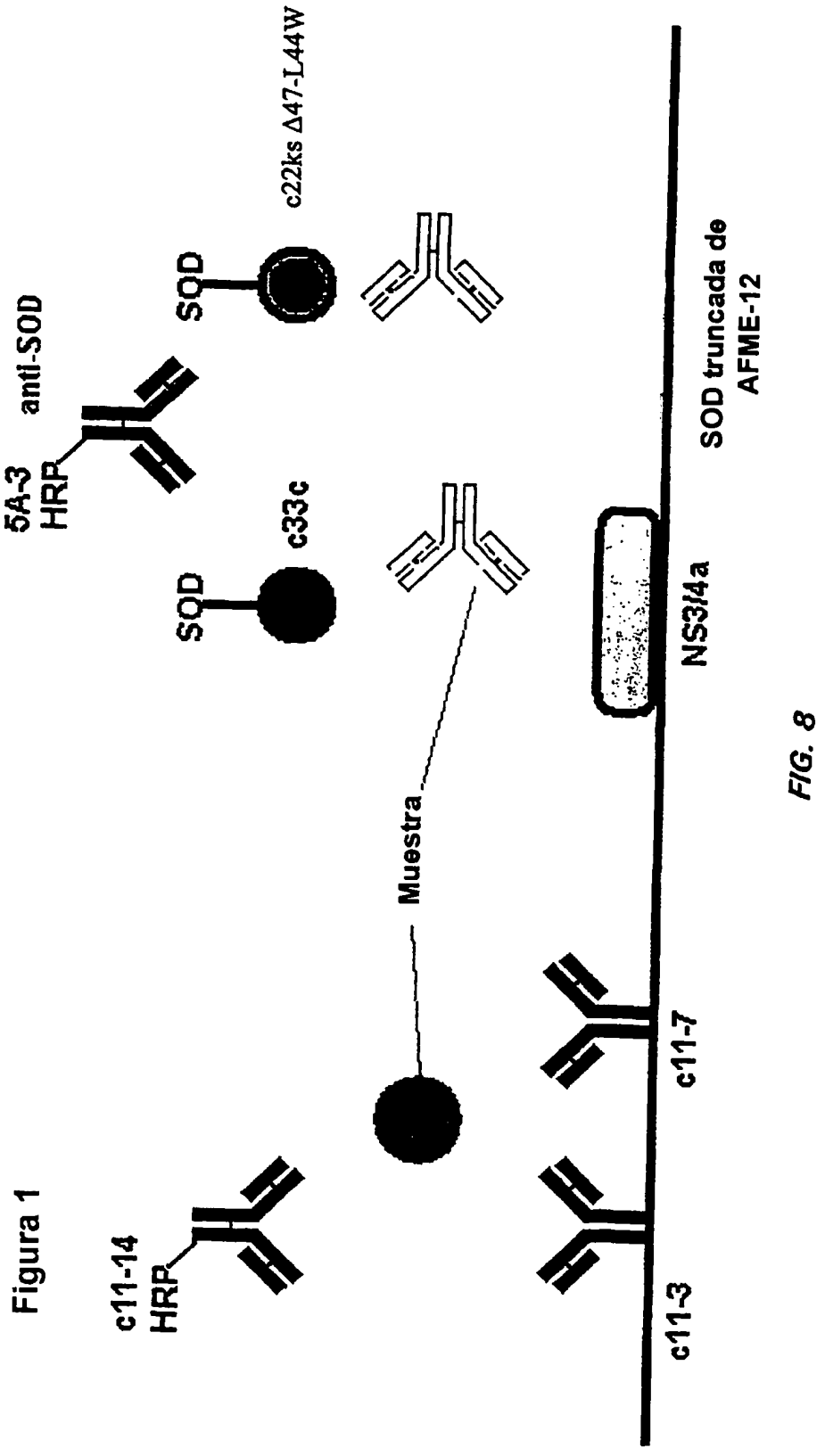

Figura 1
c11-14
HRP
5A-3
HRP
anti-SOD
SOD
c33c
SOD
c22ks Δ47-L44W
SOD
Muestra
c11-3
c11-7
NS3/4a
SOD truncada de
AFME-12
FIG. 8

FIG. 8