



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 365 800**

⑤1 Int. Cl.:
C07K 14/18 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **02257656 .5**
⑨6 Fecha de presentación : **05.11.2002**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1310512**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2003**

⑤4 Título: **Secuencias de proteína del núcleo de VHC.**

③0 Prioridad: **11.11.2001 US 347303 P**
10.10.2002 US 268569 P

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2011

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2011

⑦3 Titular/es: **ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS, Inc.**
100 Indigo Creek Drive
Rochester, New York 14626-5101, US

⑦2 Inventor/es: **Bahl, Chander**

⑦4 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

DESCRIPCION

Secuencias de proteína del núcleo de VHC

Antecedentes de la Invención

5 Un numero estimado de 170 millones de personas en todo el mundo se han infectado con el virus de LA hepatitis C (VHC). En los próximos años, el número de muertes en los Estados Unidos por cáncer y enfermedad hepática producida por VHC puede superar a las muertes producidas por el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

10 La transmisión del VHC parece requerir un contacto sangre - sangre. Al llevar una sola cadena de acido ribonucleico (ARN), el VHC contiene un solo gen, que codifica una poliproteína que posteriormente se escinde en al menos 10 proteínas funcionales. Claramente, la capacidad de ensayar en el torrente sanguíneo el VHC tiene una gran importancia. Sería útil un ensayo sensible que pudiera detectar la infección en una fase temprana.

Los ensayos de detección del VHC típicamente detectan anticuerpos contra el virus VHC. Estos anticuerpos se detectan en inmunoensayos usando proteínas y péptidos recombinantes que contienen secuencias de las proteínas de VHC. La mayoría de los ensayos anti-VHC comerciales usan proteínas de las siguientes regiones: proteína del núcleo, y secuencias de proteínas NS3, NS4 y NS5.

15 Los anticuerpos anti-núcleo de VHC son uno de los anticuerpos anti-VHC mas extendidos detectados en los individuos infectados con VHC de forma crónica. La proteína del núcleo de VHC contiene múltiples epítomos. Usando péptidos sintéticos de la región del núcleo de VHC, se ha demostrado que la mayoría de estos epítomos están en el extremo amino terminal de esta proteína. Por ejemplo, usando péptidos solapantes, cada uno de aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, se creó un ELISA para explorar anticuerpos anti-VHC en individuos infectados con VHC de forma crónica. La Tabla 1 presentada a continuación muestra las secuencias peptídicas. Como se muestra en la
20 Tabla 2 presentada más adelante, los individuos infectados con VHC tienen anticuerpos contra dos o más de esos péptidos del núcleo. De esta manera, se ha mostrado que no se necesita el péptido del núcleo completo para detectar anticuerpos anti-núcleo.

Tabla 1

Péptido ID número Secuencia de aminoácidos Localización de AA en poliproteína de VHC

0	MSTNPKPQKKNKRNT	1-15	SEC ID N°: 1
1	KNKRNTNRRPQDVKF	10-24	SEC ID N°: 2
2	QDVKFPGGGQIVGGV	20-34	SEC ID N°: 3
3	QIVGGVYLLPRRGPR	29-43	SEC ID N°: 4
4	RRGPRLGVRATRKTS	39-53	SEC ID N°: 5
5	ATRKTSESRQPRGRR	48-62	SEC ID N°: 6
6	PRGRRQPIKARRPE	58-72	SEC ID N°: 7
7	KARRPEGRTWAQPGY	67-81	SEC ID N°: 8
8	AQPGYPWPLYGNEGC	77-91	SEC ID N°: 9
9	YNEGCGWAGWLLSP	86-100	SEC ID N°: 10
10	WLLSPRGSRPSWGPT	96-110	SEC ID N°: 11
11	SWGPTDPRRRSRLNG	106-120	SEC ID N°: 12
12	SRLNGKVIDTLTCGF	116-130	SEC ID N°: 3
13	LTCGFADLMGYIPLV	126-140	SEC ID N°: 14
14	YIPLVGAPLGAARA	136-150	SEC ID N°: 15
15	GAARALAHGVRVLED	146-160	SEC ID N°: 16
16	RVLEDGVNYATGNLP	156-170	SEC ID N°: 17
17	TGNLPGCSFSIFLLA	166-180	SEC ID N°: 8

Tabla 2

Péptido	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Neg	0,04	0,00	0,02	0,075	0,059	0,069	0,076	0,103	0,020	0,034	0,002	0,088	0,051	0,028	0,023	0,034	0,041	0,042
	4	4	1															
Neg	0,04	0,06	0,01	0,081	0,051	0,081	0,103	0,111	0,033	0,035	0,002	0,085	0,038	0,030	0,023	0,030	0,038	0,052
	5	5	7															
Neg	0,05	0,00	0,01	0,075	0,087	0,079	0,094	0,102	0,025	0,034	0,002	0,071	0,038	0,033	0,021	0,031	0,039	0,047
	0	3	4															
Neg	0,01	0,04	0,13	0,023	0,034	0,039	0,034	0,039	0,012	0,018	-	0,025	0,009	0,009	0,008	0,013	0,010	0,020
	4	3	4							0,001								
Neg	0,01	0,03	0,11	0,021	0,033	0,030	0,030	0,034	0,013	0,019	0,000	0,026	0,011	0,010	0,005	0,012	0,010	0,016
	5	9	9															
Neg	0,01	0,03	0,12	0,027	0,053	0,032	0,037	0,042	0,013	0,016	0,001	0,037	0,013	0,009	0,009	0,012	0,009	0,017
	3	6	6															
Neg	0,01	0,00	0,10	0,020	0,039	0,034	0,003	0,041	0,019	0,019	0,000	0,041	0,011	0,017	0,006	0,010	0,008	0,021
	6	4	4															
9	0,25	2,50	2,50	0,425	1,443	0,106	0,218	0,248	0,062	0,015	0,025	0,049	0,030	0,013	0,012	0,021	0,012	0,028
	6	0	0															
11	0,41	2,50	2,50	0,917	0,229	0,647	0,114	0,262	0,166	0,159	0,002	0,055	0,022	0,027	0,021	0,042	0,247	0,088
	3	0	0															
15	0,04	0,66	2,50	0,067	0,577	0,057	0,110	0,072	0,061	0,032	-	0,045	0,018	0,031	0,020	0,039	0,035	0,080
	4	1	0								0,003							

(continuación)

Péptido	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
18	1,64	0,88	2,50	0,641	0,100	0,052	0,032	0,576	0,037	0,022	-	0,040	0,006	0,010	0,009	0,025	0,036	0,039
	3	7	0								0,001							
20	0,02	0,11	2,50	2,500	0,482	0,032	0,029	0,045	0,028	0,015	0,011	0,035	0,009	0,014	0,009	0,017	0,019	0,059
	1	1	0															
21	2,50	2,50	2,50	2,262	2,500	0,516	2,259	0,080	0,378	0,018	0,022	0,064	0,013	0,024	0,017	0,024	0,135	0,035
	0	0	0															
27	0,03	2,50	2,50	0,089	2,500	1,652	1,349	0,043	0,039	0,034	0,033	0,026	0,012	0,018	0,013	0,028	0,287	0,008
	2	0	0															
30	2,50	2,50	2,50	2,500	0,183	0,044	0,075	0,993	0,078	0,035	0,028	0,190	0,023	0,025	0,022	0,028	0,042	0,043
	0	0	0															
35	0,02	0,27	0,91	0,031	0,036	0,116	0,079	0,049	0,062	0,010	0,005	0,026	0,005	0,006	0,009	0,020	0,007	0,020
	2	8	2															
36	0,05	0,12	2,50	0,090	0,131	0,060	0,093	0,148	0,090	0,037	0,003	0,050	0,018	0,060	0,077	0,062	0,129	0,079
	9	9	0															
37	2,50	2,50	2,50	0,219	0,130	0,090	0,169	0,223	0,147	0,040	0,018	0,065	0,016	0,051	0,051	0,025	0,080	0,110
	0	0	0															
39	0,16	2,50	2,50	2,500	0,124	1,217	2,351	2,500	0,397	0,056	0,015	1,319	0,017	0,050	0,056	0,041	0,200	0,190
	5	0	0															

(continuación)

Péptido	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
40	0,05	2,50	2,50	2,500	0,098	0,066	0,060	0,755	0,093	0,024	0,000	0,059	0,013	0,028	0,017	0,032	0,068	0,101
	8	0	0															
42	0,02	0,04	2,50	0,031	0,023	0,150	0,018	0,036	0,023	0,011	-	0,032	0,005	0,014	0,006	0,010	0,012	0,031
	2	3	0								0,001							
43	0,158	0,61	0,36	0,033	0,065	0,103	0,069	0,075	0,053	0,051	0,001	0,055	0,025	0,022	0,015	0,023	0,029	0,035
	2	8																
44	0,04	2,24	2,50	0,511	0,070	0,060	0,086	0,301	0,108	0,066	-	0,143	0,028	0,041	0,028	0,047	0,061	0,076
	2	0	0								0,002							
45	1,00	2,50	2,50	0,174	0,713	0,055	0,129	1,722	1,896	0,029	-	0,069	0,038	0,038	0,055	0,022	0,136	0,039
	2	0	0								0,003							
46	0,01	0,03	2,50	0,022	0,021	0,021	0,038	0,035	0,031	0,027	-	0,027	0,016	0,015	0,013	0,026	0,019	0,037
	6	1	0								0,002							
47	2,48	2,50	2,50	0,449	0,750	0,593	0,102	2,006	0,331	0,017	-	0,034	0,012	0,014	0,007	0,026	0,014	0,032
	4	0	0								0,004							
48	0,42	0,20	2,50	0,364	0,356	0,038	0,049	0,070	0,027	0,029	-	0,040	0,018	0,011	0,013	0,025	0,014	0,095
	7	1	0								0,001							
49	0,01	0,48	2,50	0,044	0,045	0,047	0,050	0,246	0,039	0,025	-	0,033	0,019	0,014	0,013	0,030	0,016	0,085
	9	3	0								0,005							

(continuación)

Péptido	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
50	0,66	2,50	2,50	0,568	1,233	0,277	0,154	2,500	0,882	0,024	-	0,035	0,014	0,012	0,007	0,017	0,044	0,055
	8	0	0								0,001							
52	2,50	2,50	2,50	0,948	1,116	1,619	0,026	0,267	0,112	0,019	0,026	0,042	0,012	0,007	0,009	0,019	0,008	0,044
	0	0	0															
53	0,82	2,50	2,50	0,428	2,500	0,780	0,086	2,500	1,566	0,025	0,001	0,050	0,014	0,020	0,011	0,022	0,019	0,028
	3	0	0															
54	1,57	2,50	2,50	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	0,020	0,032	0,053	0,021	0,012	0,012	0,020	0,017	0,038
	7	0	0															
55	0,01	0,08	2,50	0,047	0,018	0,023	0,071	0,042	0,019	0,017	-	0,026	0,015	0,015	0,012	0,026	0,014	0,030
	7	3	0								0,002							
58	2,50	2,50	2,50	2,283	2,500	2,500	2,500	2,500	0,810	0,037	0,073	0,067	0,018	0,019	0,021	0,025	0,159	0,059
	0	0	0															
59	0,01	1,80	2,50	0,023	2,500	0,019	0,180	0,038	0,070	0,039	0,027	0,017	0,012	0,015	0,018	0,015	0,023	0,049
	5	5	0															
60	0,05	2,50	2,50	0,255	2,500	0,102	1,266	0,666	2,500	0,034	-	0,153	0,026	0,019	0,022	0,039	0,097	0,063
	3	0	0								0,003							
62	0,01	0,05	2,50	1,178	0,025	0,031	0,041	0,060	0,028	0,017	-	0,039	0,013	0,012	0,010	0,017	0,010	0,048
	8	3	0								0,002							

(continuación)

Péptido	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
63	0,00	0,01	0,02	0,012	0,017	0,013	1,225	0,028	0,012	0,017	-	0,026	0,007	0,007	0,006	0,010	0,057	0,020
	9	6	7								0,004							
65	1,44	0,04	0,02	0,040	0,032	0,056	0,052	0,062	0,020	0,040	0,023	0,051	0,018	0,023	0,023	0,019	0,020	0,035
	0	1	6															
66	2,06	2,50	2,50	1,030	2,500	0,508	0,144	2,500	2,500	0,013	0,009	0,060	0,007	0,009	0,009	0,014	0,025	0,018
	0	0	0															
67	2,50	2,50	2,50	2,500	2,500	1,338	0,406	2,500	0,135	0,031	0,003	0,091	0,021	0,027	0,028	0,032	0,042	0,077
	0	0	0															
68	2,50	2,50	2,50	1,105	0,415	0,358	1,025	2,500	0,263	0,028	0,006	0,039	0,023	0,025	0,022	0,024	0,034	0,037
	0	0	0															
70	0,74	2,50	2,50	0,342	2,500	0,200	0,049	0,075	1,730	0,030	0,009	0,119	0,015	0,025	0,022	0,027	0,056	0,050
	0	0	0															
73	0,03	2,39	2,50	0,049	0,629	0,935	0,596	1,119	0,081	0,040	0,009	0,052	0,028	0,036	0,031	0,038	0,043	0,059
	2	0	0															
75	0,03	2,50	2,50	1,435	1,342	0,107	0,287	0,094	0,080	0,049	0,012	0,031	0,013	0,030	0,017	0,021	0,058	0,050
	7	0	0															
78	2,50	2,50	2,50	0,269	2,500	0,298	0,051	2,500	0,040	0,057	0,006	0,084	0,013	0,022	0,014	0,021	0,022	0,030
	0	0	0															

(continuación)

Péptido	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
80	0,28	2,50	2,50	0,674	0,318	0,972	0,048	2,118	0,040	0,021	0,022	0,024	0,015	0,010	0,008	0,014	0,066	0,031
	0	0	0															
84	0,01	0,07	2,50	0,025	0,190	0,145	0,106	0,099	0,019	0,028	0,050	0,018	0,009	0,010	0,009	0,013	0,009	0,026
	2	5	0															
90	0,01	0,30	2,50	0,039	2,500	0,689	0,033	0,301	0,195	0,021	0,005	0,033	0,011	0,017	0,010	0,013	0,014	0,018
	9	6	0															

Un informe reciente indica que la proteína del núcleo de VHC puede detectarse en individuos infectados con VHC antes de la aparición de anticuerpos anti-VHC. (S. Lee y col., Vox Sanguinis, 2001; 80: 19-23). Por lo tanto, los presentes solicitantes sugieren que una forma más eficaz de detección precoz de infección por VHC sería un ensayo de combinación capaz de detectar la proteína del núcleo de VHC y anticuerpos anti-VHC que incluyen anticuerpos anti-núcleo.

Sumario de la invención

La presente invención describe péptidos y proteínas recombinantes que contienen la secuencia de la proteína del núcleo del virus de la Hepatitis C en la que uno o más de los aminoácidos se han modificado o delecionado para eliminar la capacidad de estas proteínas de unirse a anticuerpos monoclonales murinos anti-VHC específicos. Estas modificaciones se realizaron en las regiones subrayadas mostradas en la Tabla 3 presentada más adelante. Las deleciones y modificaciones se diseñan para mantener la capacidad de esta proteína de usarse en inmunoensayos usados para la detección de anticuerpos anti-VHC en individuos infectados con VHC. Estas proteínas del núcleo modificadas pueden usarse en un ensayo de combinación para la detección simultánea de proteína del núcleo de VHC y anticuerpos anti-VHC. En el ensayo de combinación podrá detectar VHC antes que los ensayos de anticuerpo usados actualmente.

Descripción detallada de la invención

Un objeto de la invención es desarrollar secuencias peptídicas que puedan detectar anticuerpos anti-VHC en presencia de anticuerpos monoclonales anti-núcleo para detectar antígeno del núcleo de VHC. Por lo tanto, un uso de estos antígenos del núcleo modificados será usarlos en un ensayo de anti-VHC/núcleo de VHC, o un "ensayo de combinación".

Para este fin, dos o más anticuerpos monoclonales de la Tabla 4 pueden aplicarse conjuntamente como un revestimiento con una o más proteínas del núcleo de VHC modificadas en una fase sólida, permitiendo de esta manera que la fase sólida capture anticuerpos anti-núcleo de VHC y antígeno del núcleo. La modificación se realiza eliminando el epítipo para el anticuerpo que se usa para la detección o captura del núcleo de VHC. La eliminación de epítipos puede conseguirse por medios conocidos en la técnica tales como la deleción de partes de la secuencia del núcleo o la alteración de aminoácidos en la secuencia del epítipo. Esto puede conseguirse, por ejemplo, sintetizando estos péptidos por síntesis química usando sintetizadores de péptidos disponibles en el mercado o modificando clones recombinantes que expresan la proteína del núcleo de VHC. Las secuencias recombinantes pueden modificarse por mutagénesis de un solo o de múltiples sitios dependiente de cebador o deleciones dependientes de cebador. (B. Tao y K.C. Lee, PCR Technology Current Innovations, 1994 por CRC Press, Inc., Capítulo 10, Mutagenesis by PCR).

Otro objeto de la invención es identificar regiones inmunodominantes de proteína del núcleo de VHC.

Otro objeto de la presente invención es determinar el patrón de reactividad con péptidos del núcleo entre individuos infectados con VHC que presentan anticuerpos anti-núcleo.

Los péptidos de la invención se generaron manteniendo las partes altamente reactivas de la proteína del núcleo y realizando modificaciones en las partes restantes de la secuencia de tal forma que el péptido no se detectara por un anticuerpo usado para detectar la proteína del núcleo en un ensayo.

En una realización preferida, el péptido se modificaría por sustitución de aminoácidos o deleción de aminoácidos en las regiones subrayadas en la Tabla 3. El resto de la secuencia mostrada en la Tabla 3 no debería alterarse.

En otra realización preferida, los péptidos se usarían en un ensayo de combinación. Éste es uno que es capaz de detectar simultáneamente tanto antígenos de VHC como anticuerpos contra VHC.

Tabla 3

Secuencia de proteína del núcleo de VHC:

SEC ID N°: 19

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATR
KTSESRQPRGRRQPIPKARRPEGRSWAOPGYWPPLYGNEGCGWAGWLLSPRGSRP
SWGPTDPRRRSRNLGKVIDTLTCGF

La eficacia y ventajas de la invención se ilustran adicionalmente por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Péptidos sintéticos

Se usaron péptidos sintéticos que incluían la secuencia entera de la secuencia de la proteína del núcleo de VHC. Se sintetizaron químicamente dieciocho péptidos solapantes mostrados en la Tabla 1 por síntesis de péptidos en fase sólida usando un sintetizador de péptidos. Todos los péptidos se sintetizaron con un resto de cisteína amida C-terminal. Los péptidos se escindieron de la resina y se purificaron por cromatografía líquida de fase inversa. La pureza de cada uno de estos péptidos, basada en el análisis de HPLC de fase inversa, fue mayor del noventa y cinco por ciento (95%). La secuencia de cada péptido se confirmó por análisis de aminoácidos del hidrolizado ácido del péptido. Las identidades estructurales de los péptidos se confirmaron por espectrometría de masas. Todos los péptidos tenían el peso molecular esperado.

Ejemplo 2

Se aplicaron péptidos sintéticos como un revestimiento sobre micropocillos Immulon 2 (fabricados por Dyanatech) en tampón borato 50 Mm a una concentración de 1 ug/ml. A cada micropocillo se le añadieron 200 ul de solución de péptido y los micropocillos se incubaron a 25 grados centígrados durante 16-20 horas. Los micropocillos se aspiraron y se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía TWEEN 20 para retirar todo el péptido no unido. Los micropocillos después se revistieron con 300 ul de PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al uno por ciento (1%) y sacarosa al tres por ciento (3%) para bloquear todos los sitios de unión de proteína disponibles. Después de 2-4 horas, las placas se aspiraron, se secaron con Turbo Dryer y se almacenaron en bolsas selladas a 2-8 grados centígrados.

Ejemplo 3

ELISA de péptido sintético

La muestra, 10 ul en 200 ul de diluyente, que se sospechaba que estaba infectada con VHC, se añadió al micropocillo revestido con péptido. Después de la incubación durante aproximadamente una hora, los micropocillos se lavaron. A los micropocillos lavados se les añadió IgG anti-humana marcada con peroxidada de rábano picante. Después de una incubación durante treinta minutos, los micropocillos se lavaron y se añadió a cada pocillo una solución de tampón orto-fenilenediamina y peróxido de hidrogeno. Después de aproximadamente 30 minutos, se añadió ácido sulfúrico a cada pocillo para detener la reacción. Un color naranja o amarillo indicó la presencia de anticuerpos anti-VHC en la muestra.

Tabla 4

<u>Anticuerpos Monoclonales</u>					
La tabla mostrada a continuación identifica 15 anticuerpos. Los anticuerpos se exploraron en cada etapa de desarrollo de anticuerpo con placas de pocillos de microtitulación revestidas con inmunógeno. El inmunógeno usado para inmunizar los ratones que producían cada cepa de anticuerpo monoclonal se identifica como uno de los siguientes: péptido ODS 243, un péptido grande definido adicionalmente en el Ejemplo 1; "FLC" significa antígeno del núcleo de longitud completa, definido en el Ejemplo 1; o péptido del núcleo n° 8 conjugado con KLH, un péptido corto, definido adicionalmente en la presente memoria. Se muestra la especificidad de cada uno por un péptido numerado y las secuencias de aminoácidos de cada péptido numerado se identifican en la presente memoria. Además, en la última columna se incluye el epítipo al que se une específicamente el anticuerpo, definido por los aminoácidos que codifican el epítipo.					
ATCC n°	FUSIÓN-AG n°, clon	IMMUNÓGENO	ISOTIPO	ESPECIFICIDAD	AA
PTA-3811	ODS243,7B4F11	Péptido ODS 243	IgG 2b	Péptido número 8 del núcleo de VHC	77-91
PTA-3803	ODS243,1E3D12	Péptido ODS 243	IgG2a	Péptido número 9 del núcleo de VHC	86-100
PTA-3802	ODS243,7C12C4	Péptido ODS 243	IgG2b	Péptido número 8 del núcleo de VHC	77-91
PTA-3813	core#3, 2A11C6	FLC	IgG1	Péptido número 11 del núcleo de VHC	106-120
PTA-3809	Core#12, 1B7A1	FLC	IgG1	Péptido número 3 del núcleo de VHC	29-43
PTA-3805	Core#13, 5A12G12	FLC	IgG1	Péptido número 4 del núcleo de VHC	39-53
PTA-3812	Core#13, 4H7E7	FLC	IgG1	Péptido número 5 del núcleo de VHC	48-62

(continuación)

PTA-3806	Core#13, 12F4A11	FLC	IgG1	Péptido número 6 del núcleo de VHC	58-72
PTA-3804	Core#13, 14D12A12	FLC	IgG1	Péptido número 7 del núcleo de VHC	67-81
PTA-3807	c22-8#4, 6D8E8	Péptido número 8 del núcleo conjugado con KLH	IgG1	Péptido número 8 del núcleo de VHC	77-91
PTA-3800	Core#12, 4G10G6	FLC	IgG2b	Péptido número 10 del núcleo de VHC	96-110
PTA-3801	Core#13, 6E7E1	FLC	IgG2a	Péptido número 11 del núcleo de VHC	106-120
PTA-3810	Core#13, 11D12A6	FLC	IgG2b	Péptido número 11 del núcleo de VHC	106-120
PTA-3808	Core#13, 14B7C3	FLC	IgG3	Péptido número 11 del núcleo de VHC	106-120
PTA-3799	Core#12, 4A6H3	FLC	IgG1	Péptido número 16 del núcleo de VHC	156-170

Ejemplo 4Uso de péptidos del núcleo modificados en una ELISA anti-VHC

- 5 Se sintetizó químicamente un péptido que consistía en los aminoácidos 1-43 de la región inmunodominante del núcleo de VHC. También se sintetizó otro péptido con ciertas deleciones en esta región, particularmente se deleccionaron los aminoácidos 1-8 y 31-33. Estos péptidos se usaron para ensayar muestras de suero de 40 pacientes crónicos de VHC con respecto al estado de anticuerpo anti-VHC. Los resultados indicaron que 39 de los 40 pacientes no estaban afectados por la deleción de esas secuencias. Los péptidos de deleción pueden usarse en combinación con anticuerpos monoclonales anti-VHC, tales como los mostrados en la Tabla 4, en un ensayo de combinación. Pueden usarse péptidos con deleciones de aminoácidos 31-33 con cualquiera de los anticuerpos monoclonales mostrados en la Tabla 4.

Tabla 5

Péptido/Espécimen ID	265-2	266-2	271-2	272-2
11	2.500	2.500	2.500	2.500
15	2.500	2.500	2.500	2.500
18	2.500	2.500	2.500	2.500
20	2.500	2.500	2.500	2.500
21	2.500	2.500	2.500	2.500
27	2.500	2.500	2.500	2.500
30	2.500	2.500	2.500	2.500
35	0.762	0.911	0.507	0.611
36	2.500	2.500	2.500	2.500
37	2.500	2.500	2.500	2.500
39	2.500	2.500	2.500	2.500
40	2.500	2.500	2.500	2.500
42	2.500	2.500	2.500	2.500
43	1.621	1.255	1.382	1.443
44	2.500	2.500	2.500	2.500
45	2.500	2.500	2.500	2.500

(continuación)

Tabla 5				
Péptido/Espécimen ID	265-2	266-2	271-2	272-2
46	2.003	1.863	1.058	1.829
47	2.500	2.500	2.500	2.500
48	2.500	2.500	2.500	2.500
49	2.500	2.500	2.500	2.500
50	2.500	2.500	2.500	2.500
52	2.500	2.500	2.500	2.500
53	2.500	2.500	2.500	2.500
54	2.500	2.500	2.500	2.500
55	2.500	2.500	2.500	2.500
58	2.500	2.500	2.500	2.500
59	2.500	2.500	2.500	2.500
60	2.500	2.500	2.500	2.500
62	2.500	2.500	2.500	2.500
65	0.056	0.045	2.237	1.704
66	2.500	2.500	2.500	2.500
67	2.500	2.500	2.500	2.500
68	2.500	2.500	2.500	2.500
70	2.500	2.500	2.500	2.500
73	2.500	2.500	2.500	2.500
75	2.500	2.500	2.500	2.500
78	2.500	2.500	2.500	2.500
80	2.500	2.500	2.500	2.500
84	2.500	2.500	2.170	2.500
90	2.500	2.500	2.500	2.500
Péptido 265 Secuencia de Aminoácidos de Poliproteína de VHC 10-43				
Péptido 266 Secuencia de Aminoácidos de Poliproteína de VHC 8-43				
Péptido 271 Secuencia de Aminoácidos de Poliproteína de VHC 1-43 con AA 31, 32 y 33 delecionados				
Péptido 272 Secuencia Consenso de la Secuencia de Aminoácidos de Poliproteína de VHC 1-43				

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.
 5 <120> Secuencias de proteína del núcleo de VHC
 <130> CDS-0288
 <150> 60/347.303
 10 <151> 11-11-2001
 <160> 19
 15 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 25 <400> 1

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Lys Lys Asn Lys Arg Asn Thr

1 5 10 15

<210> 2
 30 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 2

Lys Asn Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe

i 5 10 15

40 <210> 3
 <211> 15
 45 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 3

50
Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 4

Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg

1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 5

Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 6

Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg

1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 7

Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu

1 5 10 15

<210> 8

	<211> 15	
	<212> PRT	
5	<213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 8	
	Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr	
10	1	5 10 15
	<210> 9	
	<211> 15	
15	<212> PRT	
	<213> Virus de la hepatitis C	
20	<400> 9	
	Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys	
	1	5 10 15
	<210> 10	
25	<211> 15	
	<212> PRT	
30	<213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 10	
	Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro	
	1	5 10 15
35	<210> 11	
	<211> 15	
40	<212> PRT	
	<213> Virus de la hepatitis C	
45	<400> 11	
	Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr	
	1	5 10 15
	<210> 12	
50	<211> 15	

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 12

Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg Leu Asn Gly

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 13

Ser Arg Leu Asn Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 14

Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val

1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 15

Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala

1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

	<213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 16	
5		
	Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp	
	1 5 10 15	
	<210> 17	
10	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> Virus de la hepatitis C	
15	<400> 17	
	Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro	
	1 5 10 15	
20	<210> 18	
	<211> 15	
	<212> PRT	
25	<213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 18	
	Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala	
	1 5 10 15	
30	<210> 19	
	<211> 130	
35	<212> PRT	
	<213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 19	
	Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn	
	1 5 10 15	
	Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly	
	20 25 30	
40		

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala

35

40

45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro

50

55

60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser Trp Ala Gln Pro Gly

65

70

75

80

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp

85

90

95

Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro

100

105

110

Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys

115

120

125

Gly Phe

130

REIVINDICACIONES

1. Un kit para la detección de VHC que comprende

A) una fase sólida revestida con proteína del núcleo de VHC modificada, proteína que no es del núcleo de VHC y al menos un anticuerpo monoclonal anti-núcleo de VHC, y

B) un anticuerpo monoclonal anti-núcleo de VHC marcado,

en el que la proteína del núcleo modificada de la parte A) se ha modificado por sustitución de uno o más aminoácidos o delección de uno o más aminoácidos en al menos dos de las siguientes regiones de la proteína del núcleo de VHC:

- i) restos 1-10;
- ii) restos 30-37;
- iii) restos 43-50; y
- iv) restos 77-130,

retirándose de esta manera los sitios de unión de los anticuerpos monoclonales anti-núcleo de la parte A) y parte B), y en el que no están alterados los restos de aminoácidos 11-29, 38-42 y 51-76 de la proteína del núcleo de VHC.

2. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína que no es del núcleo de VHC se selecciona entre c200-3 y NS5.

3. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal anti-VHC marcado está marcado con una enzima, un fluoróforo o un marcador radiactivo.

4. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fase sólida es un pocillo de microtitulación, perla de poliestireno, perla magnética o membrana.

5. Una proteína del núcleo de VHC modificada, en la que la proteína del núcleo se ha modificado por sustitución de uno o más aminoácidos o delección de uno o más aminoácidos en al menos dos de las siguientes regiones de la proteína del núcleo de VHC:

- i) restos 1-10;
- ii) restos 30-37;
- iii) restos 43-50; y
- iv) restos 77-130,

y en el que los restos de aminoácidos 11-29, 38-42 y 51-76 de la proteína del núcleo de VHC no están alterados.

6. La proteína del núcleo de VHC modificada de la reivindicación 5, en la que se han delecionado los aminoácidos MSTNPKPQ (restos 1-8) y los aminoácidos VGG (restos 31-33) de la proteína del núcleo de VHC.