(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 371 925**

(51) Int. CI.:
G01N 33/576 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05814007 .0**
(96) Fecha de presentación: **26.08.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1802778**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

(54) Título: **ANTÍGENOS DE FUSIÓN DE MÚLTIPLES EPÍTOPOS DE VHC CON SITIOS PARA ESCISIÓN PROTEOLÍTICA MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS.**

(30) Prioridad:
27.08.2004 US 604858 P
12.10.2004 US 618390 P
22.10.2004 US 621502 P
25.10.2004 US 621790 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.01.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.01.2012

(73) Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
INTELLECTUAL PROPERTY - R440 P.O. BOX 8097
EMERYVILLE, CA 94662-8097, US

(72) Inventor/es:
CHIEN, David Y.;
COIT, Doris;
GEORGE-NASCIMENTO, Carlos;
SANSAN, Lin;
MEDINA-SELBY, Angelica y
TANDESKE, Laura

(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).

DESCRIPCIÓN

Antígenos de fusión de múltiples epítopos del VHC con sitios para escisión proteolítica modificados y usos de los mismos

Campo de la técnica

La presente revelación se refiere a, en general, construcciones del virus de la hepatitis C (VHC) y a procedimientos de uso de los mismos. Más particularmente, la invención se refiere a antígenos de fusión con múltiples epítopos (MEFA) inmunogénicos del VHC que contienen múltiples epítopos del VHC, con secuencias de aminoácidos modificadas para inhibir la escisión proteolítica del MEFA por NS3. Las proteínas son útiles en inmunoensayos para el diagnóstico de la infección por VHC.

Antecedentes de la invención

El VHC es un virus con cubierta con un genoma de ARN monocatenario de hebra positiva de aproximadamente 9,5 kb que codifica aproximadamente 3010 aminoácidos (Choo y col., Proc. Natl. Acad Sci. USA (1991) 88:2451-2455; Takamizawa y col., J. Virol. (1991) 65:1105-1113). La poliproteína del VHC es procesada por el huésped y las proteasas virales y se convierte en varias proteínas maduras: la proteína del núcleo (C), las glicoproteínas de la cubierta (E1 y E2) y seis proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b) (Hijikata y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:10773-10777; Grakoui y col., J. Virol. (1993) 67:1385-1395). NS3 es una proteína de 630 aminoácidos con tres actividades enzimáticas: Los aproximadamente 180 aminoácidos en N-terminal proporcionan la función de serina proteasa, mientras que los restantes dominios en C-terminal tienen tanto actividad helicasa como NTPasa (Bartenschlager y col., J. Virol. (1993) 67:3835-3844; Kim y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1995) 215:160-166; Preugschat y col., J. Biol. Chem. (1996) 271:24449-24457). La proteasa NS3 es responsable de las escisiones en los sitios de unión NS3/4a, NS4a/4b, NS4b/5a y NS5a/5b (Grakoui et al., J. Virol. (1993) 67:2832-2843). NS4a incluye aproximadamente 54 aminoácidos y actúa como cofactor de la proteasa NS3 y es esencial para el procesamiento de la poliproteína (Failla y col., J. Virol (1994) 68:3753-3760).

El VHC es el principal agente etiológico de hepatitis viral no A no B asociada con transfusión de sangre y adquiridas extrahospitalariamente (Alter y col., N. Engl. J. Med. (1989) 321:1494-1500; Choo y col., Science (1989) 244:359-362; Kuo y col., Science (1989) 244:362-364). Actualmente, el VHC afecta a aproximadamente un 3 % de la población mundial. El 70 % de estos individuos desarrolla infección crónica por VHC, que a menudo progresa a cirrosis hepática y carcinomas hepatocelulares (Bruix y col., Lancet (1989) 2:1004-1006; Saito y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6547-6549). La incidencia del VHC postransfusional ha disminuido de forma constante desde la implementación de la detección selectiva de rutina de los anticuerpos frente al VHC entre donantes sanguíneos (Pillonel y col., Transfusion (2002) 42:980-988). A pesar de la demostrada utilidad de estos ensayos para la detección selectiva en sangre y para el diagnóstico de infección por VHC en pacientes sintomáticos siguen existiendo importantes retos para la mejora del rendimiento del ensayo. Dichos retos incluyen reducir la ventana de seronegatividad, mejorar la detección de las muestras de VHC de pacientes con inmunosupresión e incrementar la sensibilidad del ensayo para detectar anticuerpos frente a diferentes epítopos específicos de genotipo del VHC.

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

Los ensayos de anticuerpos ELISA para VHC actualmente aprobados usan principalmente proteínas recombinantes que contienen epítopos lineales. Por ejemplo, en uno de los ensayos para VHC disponibles comercialmente se usan tres proteínas recombinantes del núcleo del VHC (C22-3), las regiones NS3 y NS4 (C200) y NS5 (Uyttendaele y col., Vox Sang. (1994) 66:122-129). La patente de EE.UU. nº 6.632.601 describe inmunoensayos usando epítopos conformacionales NS3/4a en combinación con antígenos de fusión de múltiples epítopos (MEFA). Para una descripción de los MEFA del VHC, véase, por ejemplo, Chien et al., J. Clin. Microbiol. (1999) 37: 1393-1397; publicación internacional nº WO 97/44469; las patentes de EE.UU. nº 6.514.731, 6.428.792; 6.632.601; y la publicación de patente de EE.UU. nº 20040142321. Los ensayos que usan estos reactivos proporcionan procedimientos sensibles y fiables para detectar la seroconversión temprana del VHC. NS3/4a, expresada en levaduras y purificada en condiciones no desnaturalizantes, tal como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.632.601, contiene las funciones de proteasa y helicasa. Dado que la NS3/4a purificada de este modo conserva la conformación nativa, se ha descubierto que es más sensible que los antígenos c200 o c33c en la detección de anticuerpos de seroconversión temprana. En los ensayos de anticuerpos con NS3/4a y MEFA 7.1 como antígenos, se detectaron anticuerpos de seroconversión 2-14 días antes que los ensayos para VHC comercializados en la actualidad. No obstante, la proteína NS3/4 sufre autohidrólisis y también escinde el MEFA 7.1 debido a la actividad de NS3 proteasa.

Las publicaciones internacionales nº WO 04/00547 y WO 01/38360, y la solicitud de patente provisional de propiedad

común nº 60/604,85 8, describen proteínas del VHC que incluyen dominios mutados de NS3 proteasa con menor actividad proteolítica. No obstante, sigue existiendo la necesidad de herramientas diagnósticas y pronósticas sensibles y precisas con el fin de proporcionar una adecuada atención al paciente, además de para prevenir la transmisión del VHC mediante sangre y productos hemoderivados o mediante contacto personal estrecho.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un antígeno modificado de fusión de múltiples epítopos (MEFA) del virus de la hepatitis C (VHC), en el que dicho MEFA comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % con la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 4, con la condición de que los aminoácidos en las posiciones 466, 467, 493, 494, 695, 696, 721, 722, 770, 771, 819 y 820, numeradas con respecto a la SEC ID Nº 4, mantengan los aminoácidos en las correspondientes posiciones de la SEC ID Nº 4.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los MEFA con sitios de escisión mutados para la NS3 proteasa son capaces de detectar infección por VHC. Los MEFA modificados de VHC son inmunorreactivos y son menos susceptibles a la escisión proteolítica mediante la NS3 proteasa del VHC. Por tanto, los MEFA se pueden usar en inmunoensayos en combinación con polipéptidos adicionales del VHC, tal como polipéptidos del VHC que conservan la actividad proteolítica del NS3. En una realización representativa de la invención, el MEFA modificado se usa en combinación con un epítopo conformacional NS3/4a en un soporte sólido de inmunoensayo. Los MEFA de la invención no se degradan durante la producción de los componentes del inmunoensayo y, por tanto, proporcionan reactivos superiores para usar en los ensayos del VHC.

El uso de MEFA proporciona las ventajas de disminución de problemas de enmascaramiento, mejora de la selectividad y mejora de la sensibilidad para detectar anticuerpos permitiendo un mayor número de epítopos en una unidad de área de sustrato. Los ensayos descritos en el presente documento se pueden usar para detectar infección por VHC producida por cualquiera de los seis genotipos conocidos del VHC.

También se divulgan en el presente documento un antígeno de fusión de múltiples epítopos (MEFA) modificado del VHC, en el que el MEFA comprende al menos un epítopo del dominio de la helicasa del VHC que comprende un sitio de escisión proteolítica de NS3 del VHC y al menos un epítopo de una región de NS4 que comprende un sitio de escisión proteolítica de NS3 del VHC, en el que los sitios de escisión proteolítica de NS3 del VHC presentes en el epítopo del dominio de la helicasa y el epítopo del NS4 están mutados, de un modo tal que la escisión proteolítica del MEFA modificado por NS3 está inhibida con respecto a la escisión proteolítica de un MEFA correspondiente que carece de mutaciones, y en el que, adicionalmente, el MEFA modificado reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.

En ciertos aspectos de la divulgación, las mutaciones en los sitios de escisión comprenden una sustitución de al menos un aminoácido en cada uno de los sitios, tales como una sustitución de los aminoácidos naturales que se encuentran en las posiciones 1428, 1429, 1455 y 1456, numerados con respecto a la secuencia del VHC-1. En otros aspectos, el MEFA modificado comprende una sustitución en la unión NS3/4a de los aminoácidos naturales que se encuentran en las posiciones 1657 y 1658, numerados con respecto a la secuencia del VHC-1.

En otros aspectos adicionales, el epítopo de la región NS4 es 5-1-1 y comprende una sustitución de los aminoácidos naturales que se encuentran en las posiciones 1711 y 1712, numerados con respecto a la secuencia del VHC-1. En ciertos aspectos, el MEFA comprende tres epítopos 5-1-1 de las cepas del VHC 1, 2 y 3, respectivamente, en los que cada uno de los aminoácidos naturales que se encuentran en las posiciones 1711 y 1712 en cada uno de los epítopos 5-1-1, numerados con respecto a la secuencia del VHC-1, están sustituidos.

En aspectos adicionales, el MEFA comprende la secuencia contigua de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1193-1658, numerados con respecto al VHC-1 con una sustitución de los aminoácidos naturales que se encuentran en las posiciones 1428, 1429, 1455, 1456, 1657 y 1658, numerados con respecto a la secuencia del VHC-1, y dicho MEFA comprende además tres epítopos 5-1-1 de las cepas del VHC 1, 2 y 3, respectivamente, en el que cada uno de los epítopos 5-1-1 comprende la secuencia contigua de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1689-1735, numerados con respecto al VHC-1 con una sustitución de cada uno de los aminoácidos naturales que se encuentran en las posiciones 1711 y 1712, numerados con respecto a la secuencia del VHC-1.

En realizaciones adicionales de la invención, el MEFA comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % con, o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % a la misma, tal como una identidad de secuencia de al menos 90 % o al menos 98 % con la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 4, con la condición de que los aminoácidos en las posiciones 466, 467, 493, 494, 695, 696, 721, 722, 770, 771, 819 y 820 de la SEC ID Nº 4 mantengan la mutación que inhibe la escisión proteolítica de NS3 del MEFA. En ciertas realizaciones, el MEFA comprende la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 4. En otras realizaciones adicionales, el MEFA consiste en la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 4.

En realizaciones adicionales, la invención está dirigida a un soporte sólido de inmunoensayo que comprende un MEFA modificado tal como se ha descrito anteriormente. En realizaciones adicionales, el soporte sólido de inmunoensayo comprende además al menos un epítopo conformacional NS3/4a del VHC, en el que el epítopo conformacional NS3/4a reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.

En ciertas realizaciones, el epítopo conformacional NS3/4a comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 %, tal como una identidad de secuencia de al menos 90 % o al menos 98 %, con la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 6. En ciertas realizaciones, el epítopo conformacional NS3/4a comprende la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 6. En otras realizaciones, el epítopo conformacional NS3/4a consiste en la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 6.

En realizaciones adicionales, la invención está dirigida a un procedimiento de detección de infección por virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica. El procedimiento comprende:

(a) proporcionar un soporte sólido de inmunoensayo como se ha descrito anteriormente;

(b) combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permitan que los anticuerpos del VHC, cuando estén presentes en la muestra biológica, se unan al MEFA y al epítopo conformacional NS3/4a si está presente, para formar un primer complejo inmunitario.

(c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones formadoras de complejo un anticuerpo marcado de forma que se pueda detectar, en el que el anticuerpo marcado reacciona con el complejo inmunitario; y

(d) detectar segundos complejos inmunitarios formados entre el anticuerpo marcado de forma que se pueda detectar y el primer complejo inmunitario, si existen, como indicación de infección por VHC en la muestra biológica.

En otras realizaciones adicionales, la invención está dirigida a un kit de prueba inmunodiagnóstica que comprende un soporte sólido de inmunoensayo tal como se ha descrito anteriormente, e instrucciones para realizar la prueba inmunodiagnóstica.

En realizaciones adicionales, la invención está dirigida a un polinucleótido que comprende una secuencia codificadora para un MEFA modificado tal como se ha descrito anteriormente y un vector recombinante que comprende el polinucleótido y elementos de control unidos operativamente al polinucleótido, con lo cual la secuencia codificadora se puede transcribir y traducir en una célula huésped. En realizaciones adicionales, la invención está dirigida a una célula huésped transformada con el vector recombinante. En realizaciones adicionales más, la invención está dirigida a un procedimiento para producir un MEFA recombinante, que comprende:

(a) proporcionar una población de células huésped descrita anteriormente; y

(b) cultivar la población de células en condiciones mediante las cuales se expresa el antígeno de fusión de múltiples epítopos codificado por la secuencia codificadora presente en el vector recombinante.

En realizaciones adicionales más, la invención está dirigida a un procedimiento para producir un soporte sólido de inmunoensayo, que comprende:

(a) proporcionar un soporte sólido; y

(b) unir al soporte sólido al menos un MEFA modificado tal como se ha descrito anteriormente.

En ciertas realizaciones, la invención comprende además unir al soporte sólido en una posición discreta un epítopo conformacional NS3/4a del VHC, en el que el epítopo conformacional reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC. En ciertas realizaciones, el epítopo conformacional NS3/4a comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 %, tal como una identidad de secuencia de al menos 90 % o al menos 98 %, con la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 6. En ciertas realizaciones, el epítopo conformacional NS3/4a comprende la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 6. En otras realizaciones, el epítopo conformacional NS3/4a consiste en la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 6.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación en diagrama del genoma del VHC, que representa las diversas regiones de la poliproteína de la cual derivan los presentes reactivos del ensayo (proteínas y anticuerpos).

La Figura 2 es un dibujo esquemático de un inmunoensayo representativo que usa un MEFA modificado de acuerdo con la invención, en el que los antígenos del VHC están inmovilizados sobre un soporte sólido.

La Figura 3 es un dibujo esquemático de un formato de inmunoensayo representativo que usa un MEFA modificado con un soporte sólido revestido con estreptavidina.

La Figura 4 es una representación en diagrama del MEFA 7.1.

Las Figuras 5A-5F (SEC ID Nº 1 y 2) representan el ADN y la correspondiente secuencia de aminoácidos del MEFA 7.1.

Las Figuras 6A-6D son diagramas de la construcción de psMEFA7.

La Figura 7 es un diagrama de la construcción de psMEFA7.1.

La Figura 8 es una representación en diagrama del MEFA 7.2.

Las Figuras 9A-9F (SEC ID Nº 3 y 4) representan el ADN y la correspondiente secuencia de aminoácidos del MEFA 7.2.

Las Figuras 10A-10B muestran una comparación entre las secuencias de aminoácidos de MEFA 7.1 (SEC ID Nº 2) y MEFA 7.2 (SEC ID Nº 4). Los cambios están indicados en negrita.

Las Figuras 11A-11C son diagramas de la construcción de ps.mefa7.2.

Las Figuras 12A-12C muestran MEFA representativos que se pueden modificar para usar con los inmunoensayos objeto.

La Figura 12A es una representación en diagrama de MEFA 3. La Figura 12B es una representación en diagrama de MEFA 5. La Figura 12C es una representación en diagrama de MEFA 6.

Las Figuras 13A a 13D (SEC ID Nº 5 y 6) representan el ADN y la correspondiente secuencia de aminoácidos de un antígeno conformacional NS3/4a representativo para usar en los presentes ensayos, denominado en el presente documento "NS3/4a PI". Los aminoácidos en las posiciones 403 y 404 de las Figures 13A a 13D representan sustituciones de Thr por Pro, y Ser por Ile, de la secuencia de aminoácidos nativa del VHC-1

Las Figuras 14A y 14B muestran la actividad proteasa de NS3/4a PI y su efecto sobre MEFA 7.1 y MEFA 7.2 La Figura 14A muestra un gel de SDS-PAGE y la Figura 14B muestra una transferencia de tipo western.

Descripción detallada de la invención

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

También cabe indicar que, como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “uno”, “una” y “el/la" comprenden las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, 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 aminoácidos:

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

Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

I. Definiciones

En la descripción de la presente invención se emplearán los términos siguientes y se pretende definirlos como se indica a continuación.

La expresión “que comprende" abarca “que incluye” además de “constituido por”, *por ejemplo* una composición “que comprende” X puede estar constituido sólo por X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

El término “sustancialmente” no excluye “completamente”, *por ejemplo*, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, el término “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

Los términos “polipéptido” y “proteína” se refieren a un polímero de residuos de aminoácido y no están limitados a una longitud mínima del producto. Por tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares están incluidos dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como fragmentos de las mimas están dentro de la definición. Los términos también incluyen las modificaciones postexpresión del polipéptido, por ejemplo glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. De forma adicional, para los fines de la presente invención un “polipéptido” se refiere a una proteína que incluye “modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservadora), en la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como las realizadas mediante mutagénesis dirigida al sitio, o puede ser accidental, tal como mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR.

Un polipéptido del VHC es un polipéptido, como se ha definido anteriormente, derivado de la poliproteína del VHC. El polipéptido no tiene que derivar físicamente del VHC, sino que puede producirse de forma sintética o recombinante. Además, el polipéptido puede derivar de cualquier de las diversas cepas y aislamientos del VHC, tales como, entre otros, cualquiera de los aislamientos de las cepas 1, 2, 3, 4, 5 o 6 del VHC. Se conocen numerosas regiones conservadas y variables entre estas cepas y, en general, las secuencias de aminoácidos de los epítopos derivados de estas regiones tendrán un grado alto de homología de secuencia, por ejemplo una homología de secuencia de aminoácidos superior al 30 %, preferentemente superior al 40 %, cuando las dos secuencias están alineadas. Por tanto, por ejemplo, el término polipéptido "NS3/4a" se refiere a NS3/4a nativa de cualquiera de las diversas cepas del VHC, así como análogos, muteínas y fragmentos inmunogénicos de "NS3/4ª, tal como se define adicionalmente más adelante. Los genotipos completos de muchas de estas cepas se conocen. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 6.150.087 y los números de registro en GenBank AJ238800 y AJ238799.

Con un polipéptido “derivado de” una poliproteína del VHC se quiere decir un polipéptido que comprende una secuencia de una o más regiones o porciones de regiones de la poliproteína del VHC de referencia. Normalmente, el polipéptido está compuesto por regiones o porciones de regiones que incluyen epítopos y, en general, tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la del polipéptido de referencia, como se define más adelante. Por tanto, la expresión “derivado de” se usa para identificar la fuente original de una molécula, pero no se pretende limitar el procedimiento mediante el cual se produce la molécula que puede ser, por ejemplo, mediante síntesis química o medios recombinantes.

Los términos “análogo” y “muteína” hace referencia a derivados biológicamente activos de la molécula de referencia, o fragmentos de dichos derivados, que conservan la actividad deseada, tal como inmunorreactividad en los ensayos que se describen en el presente documento. En general, el término “análogo” hace referencia a compuestos que tienen una secuencia y estructura de polipéptidos nativa con una o más adiciones, sustituciones (en general de naturaleza conservadora de un MEFA modificado, en general de naturaleza no conservadora en los sitios de escisión proteolítica de NS3) y/o deleciones de aminoácidos, respecto a la molécula nativa, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad inmunogénica. El término “muteína” se refiere a polipéptidos que tienen una o más moléculas similares a aminoácidos, que incluyen, entre otros, compuestos que comprenden sólo moléculas amino y/o imino, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, moléculas naturales y no naturales (p. ej., sintéticas), en forma de ciclos, ramificadas y similares. El término también incluye moléculas que comprenden uno o más residuos de glicina N-sustituidos (un “peptoide”) y otros aminoácidos o péptidos sintéticos. (Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.831.005; 5.877.278; y 5.977.301; Nguyen y col., Chem Biol. (2000) 7:463-473; y Simon y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:9367-9371 para descripciones de peptoides). Preferentemente, el análogo o muteína tiene al menos la misma inmunoactividad que la molécula nativa. En la técnica se conocen procedimientos para fabricar análogos y muteínas de polipéptidos, y se describen adicionalmente más adelante.

Como se ha explicado anteriormente, los análogos incluyen, en general, sustituciones de naturaleza conservadora, es decir sustituciones que tienen lugar en una familia de aminoácidos que están relacionados por sus cadenas laterales. Específicamente, en general, los aminoácidos se dividen en cuatro familias: (1) ácidos – aspartato y glutamato; (2) básicos – lisina, arginina, histidina; (3) no polares -- alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga – glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. En ocasiones, los aminoácidos fenilalanina, triptófano y tirosina se clasifican como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonablemente predecible que una sustitución aislada de leucina con isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o una sustitución conservadora similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o incluso hasta aproximadamente 15-25 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o cualquier número entero entre 5-25 siempre que la función deseada de la molécula permanezca intacta. Un experto en la técnica puede determinar con facilidad regiones de la molécula de interés que pueden tolerar cambios con referencia a los gráficos de Hopp/Woods y Kyte-Doolittle, bien conocidos en la técnica.

La expresión “antígeno de fusión de múltiples epítopos” o “MEFA”, como se usa en el presente documento quiere decir un polipéptido en el que múltiples antígenos virales están dispuestos como una cadena sencilla y continua de aminoácidos, cadena que no se produce en la naturaleza. Como se usa en el presente documento, los MEFA están limitados a antígenos del VHC. Los antígenos del VHC pueden estar conectados directamente entre sí mediante enlaces peptídicos o pueden estar separados por secuencias de aminoácidos intermedios. Los antígenos de fusión pueden también contener secuencias exógenas a la poliproteína del VHC. Además, las secuencias del VHC presentes pueden derivar de múltiples genotipos y/o aislamientos del VHC. Ejemplos de MEFA concretos que se pueden modificar para usar en los presentes inmunoensayos se detallan en, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 97/44469; las patentes de EE.UU. nº 6.514.731.6.428.792 y 6.632.601. Los MEFA se describen adicionalmente a continuación.

Por “MEFA modificado” se quiere decir un MEFA como se ha definido anteriormente con una mutación en la secuencia del antígeno del VHC natural en uno o más sitios de escisión proteolítica de NS3, de modo que se inhibe la actividad proteasa de NS3 en el MEFA. Por tanto, los MEFA modificados son menos susceptibles a la escisión proteolítica por la NS3 proteasa en comparación con el MEFA parental no modificado. Los MEFA modificados incluirán al menos un epítopo modificado del dominio helicasa y, preferentemente, epítopos de NS4a/NS4b y/o NS5a. Por “epítopo modificado” se quiere decir que uno o más sitios de escisión proteolítica de NS3 dentro del epítopo está mutado en comparación con la secuencia de aminoácidos natural de modo que se inhibe la escisión proteolítica del MEFA por la NS3 proteasa. Las mutaciones presentes en el MEFA modificado pueden incluir una o más adiciones, sustituciones (en general, de naturaleza no conservadora) y/o deleciones de aminoácidos respecto a la molécula nativa, en la que la susceptibilidad a la escisión proteolítica de NS3 se reduce o elimina. En la técnica se conocen procedimientos para medir la escisión proteolítica del MEFA objeto e incluyen incubar los MEFA en cuestión con una proteína que se sabe que tiene actividad NS3 proteolítica, tal como el antígeno conformacional de NS3/4a que se trata más adelante y se muestra en las Figuras 13A-13D, y monitorizar los MEFA para determinar la escisión. Este ensayo se describe con detalle en los ejemplos.

Por “fragmento” se quiere decir un polipéptido que consiste en sólo una parte de la secuencia polipeptídica de longitud completa y de la estructura intactas. El fragmento puede incluir una deleción en C-terminal y/o una deleción en N-terminal del polipéptido nativo. Un “fragmento inmunogénico” de una proteína concreta del VHC incluirá, en general, al menos aproximadamente 5-10 residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, preferentemente al menos aproximadamente 15-25 residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa y, más preferentemente, al menos aproximadamente 20-50 o más residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, que definen un epítopo, o cualquier número entero entre 5 aminoácidos y la secuencia de longitud completa, siempre que el fragmento en cuestión conserve inmunorreactividad en los ensayos descritos en el presente documento. Por ejemplo, los fragmentos inmunogénicos preferidos, incluyen, entre otros, fragmentos del núcleo del VHC que comprenden, por ejemplo, los aminoácidos 10-45, 10-53, 67-88 y 120-130 de la poliproteína, el epítopo 5-1-1 (en la región NS4a/NS4b del genoma viral), así como epítopos definidos derivados de cualquiera de las regiones de la poliproteína mostrada en la Figura 1, tal como, entre otros, E1, E2, NS3 (p. ej., un polipéptido c33c de la región NS3), NS4 (p. ej., el polipéptido c100 de las regiones NS3/NS4), las regiones NS3/4a y NS5 de la poliproteína del VHC, así como cualquiera de los demás epítopos identificados de la poliproteína del VHC. Véase, por ejemplo, Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien y col., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chien y col., publicación internacional nº WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional nº WO 94/01778; patentes de EE.UU. nº 6.150.087 y 6.121.020.

El término “epítopo”, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia polipeptídica de al menos 3 a 5, preferentemente de aproximadamente 5 a 10 o 15, y no más de aproximadamente 1.000 aminoácidos (o cualquier número entero entre ellos), que definen una secuencia que, por sí misma o como parte de una secuencia más grande, se une a un anticuerpo generado como respuesta a dicha secuencia. No hay un límite superior crítico de la longitud del fragmento, que puede comprender casi toda la longitud de la secuencia proteica, o incluso una proteína de fusión que comprende dos o más epítopos de la poliproteína del VHC. Un epítopo para usar en la invención objeto no está limitado a un polipéptido que tenga la secuencia exacta de la porción de la proteína parental de la cual deriva. De hecho, los

genomas virales están en un estado de flujo constante y contienen varios dominios variables que exhiben grados relativamente altos de variabilidad entre los aislamientos. Por tanto, el término “epítopo” abarca secuencias idénticas a la secuencia nativa, así como modificaciones de la secuencia nativa tales como deleciones, adiciones y sustituciones internas adicionales (normalmente de naturaleza conservadora).

Las regiones de un polipéptido dado que incluyen un epítopo se pueden identificar usando numeroras técnicas de mapeo de epítopos bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, se pueden determinar epítopos lineales mediante, por ejemplo, síntesis concurrente de números elevados de péptidos sobre soportes sólidos, en los que los péptidos corresponden a porciones de la molécula proteica y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos siguen unidos a los soportes. Dichas técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.08.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen y col. (1985) Proc. Natl. Acad Sci. USA 82:178-182; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. Usando dichas técnicas se han identificado numerosos epítopos del VHC. Véase, por ejemplo, Chien y col., Viral Hepatitis and Liver Disease (1994) pág. 320, -324 y más adelante. De forma similar, los epítopos conformacionales se identifican con facilidad determinando la conformación espacial de los aminoácidos, tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, anteriormente. Las regiones antigénicas de proteínas también se pueden identificar usando gráficos de antigeneicidad e hidropatía convencionales, tales como los calculados usando, por ejemplo, el programa de software Omiga versión 1.0 disponible en Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el procedimiento de Hopp/Woods Hopp y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1981) 78:3824-3828 para determinar los perfiles de antigeneicidad, y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte y col., J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132 para gráficos de hidropatía.

Como se usa en el presente documento, la expresión "epítopo conformacional" se refiere a una porción de una proteína de longitud completa o un análogo o muteína de la misma, que tiene características estructurales nativas de la secuencia de aminoácidos que codifica el epítopo en la proteína natural de longitud completa. Las características estructurales nativas incluyen, entre otras, glicosilación y estructura tridimensional. La longitud de la secuencia que define el epítopo puede estar sujeta a amplias variaciones, ya que se cree que estos epítopos están formados por la forma tridimensional del antígeno (p. ej., plegamiento). Por tanto, los aminoácidos que definen el epítopo `pueden ser relativamente pocos en número pero ampliamente dispersados a lo largo de la longitud de la molécula (o incluso en diferentes moléculas en el caso de los dímeros etc.), llegando a la correcta conformación del epítopo a través del plegamiento. Las porciones del antígeno entre los residuos que definen el epítopo pueden no ser cruciales para la estructura conformacional del epítopo. Por ejemplo, la deleción o sustitución de estas secuencias intermedias pueden no afectar al epítopo conformacional siempre que las secuencias cruciales para la conformación del epítopo se mantengan (p. ej. las cisternas implicadas en los puentes disulfuro, los sitios de glicosilación etc.).

Los epítopos conformacionales presentes en, por ejemplo, la región NS3/4a, se identifican fácilmente usando procedimientos tratados anteriormente. Además, la presencia o ausencia de un epítopo conformacional en un polipéptido dado se puede determinar con facilidad mediante detección selectiva del antígeno de interés con un anticuerpo (suero policlonal o monoclonal frente al epítopo conformacional) y comparando su reactividad con la de una versión desnaturalizada del antígeno que sólo conserva epítopos lineales (en su caso). En dicha detección selectiva usando anticuerpos policlonales, puede ser ventajoso absorber el suero policlonal primero con el antígeno desnaturalizado y ver si conserva anticuerpos frente al antígeno de interés. Adicionalmente, en el caso de NS3/4a, una molécula que conserve la conformación nativa también tendrá actividades enzimáticas de tipo proteasa y, opcionalmente, helicasa. Dichas actividades se pueden detectar usando ensayos enzimáticos, como se describe adicionalmente más adelante.

Preferentemente, un epítopo conformacional se produce de forma recombinante y se expresa en una célula a partir de la cual se puede extraer en condiciones que conserven sus características estructurales deseadas, por ejemplo sin desnaturalización del epítopo. Dichas células incluyen células de bacterias, levaduras, insectos y de mamífero. La expresión y el aislamiento de epítopos conformacionales recombinantes de la proteína del VHC se describen en, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 96/04301, WO 94/01778, WO 95/33053, WO 92/08734. Como alternativa, es posible expresar los antígenos y renaturalizar después la proteína tras la recuperación. También se entiende que la síntesis química puede también proporcionar mimítopos antigénicos conformacionales que reaccionan de forma cruzada con el epítopo conformacional del antígeno “nativo”.

Un "anticuerpo” quiere decir una molécula que se une específicamente a un epítopo de interés presente en un antígeno. Por “se une específicamente” se quiere decir que el anticuerpo reconoce e interacciona con el epítopo mediante una interacción de tipo "llave y cerradura" para formar un complejo entre el antígeno y el anticuerpo, frente a la unión inespecífica que se podría producir entre el anticuerpo y, por ejemplo, el sustrato de prueba. Por tanto, por ejemplo un anticuerpo del núcleo del VHC es una molécula que se une específicamente a la proteína del núcleo del VHC, un anticuerpo frente a NS3/4a del VHC es una molécula que une específicamente a un epítopo de una proteína NS3/4a del VHC y así sucesivamente. De forma similar, un antígeno de interés “reacciona específicamente” son un anticuerpo, cuando el anticuerpo “se une específicamente” a un epítopo presente en el antígeno. El término “anticuerpo”, como se usa

en el presente documento, incluye los anticuerpos obtenidos de preparaciones tanto policlonales como monoclonales, así como de los siguientes: moléculas de anticuerpos híbridos (quiméricos (véase, por ejemplo, Winter y col. (1991) Nature 349:293-299; y la patente de EE.UU. nº 4.816.567); los fragmentos F(ab')2 y F(ab); las moléculas Fv (heterodímeros no covalentes, véase, por ejemplo, Inbar y col. (1972) Proc Natl Acad Sci USA 69:2659-2662; y Ehrlich y col. (1980) Biochem 19:4091-4096); moléculas Fv de cadena sencilla (sFv) (véase, por ejemplo, Huston y col. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-5883); construcciones de fragmentos de anticuerpos diméricos y triméricos; minicuerpos (véase, por ejemplo, Pack y col. (1992) Biochem 31:1579-1584; Cumber y col. (1992) J Immunology 149B:120-126); moléculas de anticuerpos humanizados (véase, por ejemplo, Riechmann y col. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyan y col. (1988) Science 239:1534-1536; y la publicación de patente del Reino Unido nº GB 2.276.169, publicada el 21 de septiembre de 1994); y, cualquier fragmento funcional obtenido de dichas moléculas, en el que dichos fragmentos conservan las propiedades de unión inmumológica de la molécula del anticuerpo parental.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición de anticuerpo que tiene una población homogénea de anticuerpos. El término no está limitado por las especies o la fuente del anticuerpo, ni tampoco se pretende que esté limitado por el modo en el que se fabrica. Por tanto, el término abarca anticuerpos obtenidos de hibridomas murinos, así como de anticuerpos monoclonales humanos obtenidos usando hibridomas humanos en lugar de murinos. Véase, por ejemplo, Cote y col. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 1985, pág. 77.

Por "aislado" se quiere decir, al hacer referencia a un polipéptido, que la molécula indicada es distinta y diferenciada del organismo entero con el cual 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 desprovista, todo o en parte, de secuencias asociadas normalmente con ella en la naturaleza; o una secuencia, como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas asociadas en ella; o una molécula disociada del cromosoma.

Por "determinante antigénico equivalente" se quiere decir un determinante antigénico de diferentes subespecies o cepas de VHC, tal como las cepas 1, 2 o 3 del VHC. Más específicamente, se conocen epítopos, como el "5-1-1", que se producen aproximadamente en las posiciones 1694-1735, numeradas respecto a la secuencia poliproteína del VHC-1 (véase la Figura 1) y dichos epítopos varían entre las cepas 1, 2 y 3. Por tanto, el epítopo 5-1-1 de las tres cepas diferentes son determinantes antigénicos equivalentes y, por tanto, son "copias" aunque sus secuencias no sean idénticas. En general, las secuencias de aminoácidos de determinantes antigénicos equivalentes tendrán un grado alto de homología de secuencia, por ejemplo una homología de secuencia de aminoácidos superior al 30 %, preferentemente superior al 40 %, cuando las dos secuencias están alineadas.

"Homología" se refiere al porcentaje de similitud entre dos restos polinucleotídicos o dos polipeptídicos. Dos secuencias de ADN, o dos secuencias polipeptídicas, son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias exhiben al menos aproximadamente 50 %, preferentemente al menos aproximadamente 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente 80-85 %, preferentemente al menos aproximadamente 90 % y más preferentemente al menos aproximadamente 95 %-98 % de similitud de secuencia sobre una longitud definida de las moléculas. Como se usa en el presente documento, sustancialmente homólogo también se refiere a moléculas que muestran identidad completa con el ADN o la secuencia polipeptídica especificados.

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

Se pueden usar programas informáticos disponibles fácilmente para ayudar al análisis de la homología y la identidad, tal como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 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 peptídico.. Programas para determinar la homología de la secuencia nucleotídica están disponibles en el paquete Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también dependen del algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se usan fácilmente con los parámetros predeterminados recomendados por el fabricante y descritos en el paquete Wisconsin Sequence Analysis Package al que se ha hecho referencia anteriormente. Por ejemplo, el porcentaje de homología de una secuencia nucleotídica concreta con una secuencia de referencia se puede determinar usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuaciones predeterminadas y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Otro procedimientos de establecer un porcentaje de homología en el contexto de la presente invención es usar el paquete MPSRCH de programas de cuyos derechos es propietaria la University of Edimburgo, desarrollados por John F. Collins y

Shane S. Sturrok, y distribuidos por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA) De este grupo de paquetes se puede emplear el algoritmo de Smith-Waterman en el que se usan los parámetros predeterminados para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por hueco abierto de 12, penalización por extensión de hueco de uno y un hueco de seis). De los datos generados, el valor "Correspondencia" refleja "homología de secuencia". Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias generalmente se conocen en la técnica, por ejemplo otro programa de alineación es el BLAST, que se usa con parámetros predeterminados. Por ejemplo, BLASTN y BLASTP pueden usarse usando los siguientes parámetros predeterminados: Código genético= estándar; filtro= ninguno; hebra= ambas; corte= 60; previsto= 10; Matriz= BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificadas por = PUNTUACIÓN ALTA; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas están disponibles fácilmente.

Como alternativa, la homología se puede determinar mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa(s) específicas de una cadena y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas se pueden identificar en un experimento de hibridación de tipo southern en, por ejemplo, condiciones estrictas tal y como se define para ese sistema concreto. La definición de las condiciones de hibridación adecuadas está dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., ant.; DNA Cloning, ant.; Nucleic Acid Hybridization, ant.

Una "secuencia codificadora" o una secuencia que "codifica" un polipéptido seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido in vitro o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras adecuadas. Los límites de la secuencia codificadora están determinados por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia de terminación de la transcripción puede localizarse en 3' de la secuencia de codificación.

"Unido operativamente" se refiere a una organización de elementos en la que los componentes así descritos están configurados de modo que realizan su función deseada. Por tanto, un promotor dado operativamente unido a una secuencia codificadora es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificadora cuando están presentes los factores de transcripción adecuados. El promotor no necesita estar contiguo a la secuencia codificadora, mientras que funcione dirigiendo su expresión. Por tanto, por ejemplo, las secuencias intermedias sin traducir pero transcritas pueden estar presentes entre la secuencia promotora y la secuencia codificadora, como también puede haber intrones transcritos, y la secuencia promotora puede seguir considerándose "unida operablemente" a la secuencia codificadora.

"Recombinante", como se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, viral, semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociada con nada o una porción del polinucleótido con el que está asociada en la naturaleza. El término "recombinante", como se usa con respecto a una proteína o polipéptido quiere decir un polipéptido producido mediante la expresión de un polinucleótido recombinante. En general, el gen de interés se colona y después se expresa en organismos transformados, como se describe más adelante. El organismo huésped expresa el gen extraño para producir la proteína en condiciones de expresión.

Un "elemento de control" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que ayuda en la expresión de una secuencia codificadora a la que está unido. Él término incluye promotores, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en 5', señales de poliadenilación, regiones no traducidas, incluidas 5'-UTR y 3'-UTR, y, cuando sea adecuado, secuencias líder y potenciadores, que, en conjunto, proporcionan la transcripción y traducción de una secuencia codificadora en una célula huésped.

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

Una secuencia de control "dirige la transcripción" de una secuencia de codificación en una célula cuando la ARN polimerasa se une a la secuencia promotora y transcribe la secuencia codificadora en ARNm, que a su vez se traduce en el polipéptido codificado por la secuencia codificadora.

"Casete de expresión" o "construcción de expresión" se refiere a un ensamblaje que puede dirigir la expresión de la(s) secuencia(s) o gen(es) de interés. El casete de expresión incluye elementos de control, como se ha descrito anteriormente, tal como un promotor que está unido operativamente a la(s) secuencia(s) o gen(es) de interés (para dirigir su transcripción directa) y a menudo también incluye una secuencia de poliadenilación. En ciertas realizaciones de la invención, el casete de expresión descrito en el presente documento puede estar contenido dentro de una construcción plasmídica. Además de los componentes del casete de expresión, la construcción plasmídica puede también incluir uno o

más marcadores seleccionables, una señal que permite que la construcción plasmídica exista como ADN monocatenario (p. ej., un origen de replicación de M13), al menos un sitio de clonación múltiple y un origen de replicación de “mamífero” (p. ej., un origen de replicación de SV40 o de adenovirus).

“Transformación”, como se usa en el presente documento, se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, al margen del procedimiento usado para la inserción: por ejemplo, transformación mediante captación directa, transfección, infección y similares. Para procedimientos concretos de transfección, véase más adelante. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como vector no integrado, por ejemplo, un episoma, o, como alternativa, puede integrarse en el genoma del huésped.

Una “célula huésped” es una célula que se ha transformado, o es capaz de transformarse, con una secuencia de ADN exógeno.

Como se usa en el presente documento, una “muestra biológica” se refiere a una muestra de tejido o fluido aislado de un sujeto que normalmente incluye anticuerpos producidos por el sujeto. Las muestras típicas que incluyen dichos anticuerpos se conocen en la técnica e incluyen, entre otras, sangre, plasma, suero, material fecal, orina, médula ósea, bilis, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, muestras de la piel, secreciones externas de la piel, los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, muestras derivadas del epitelio gástrico y la mucosa gástrica, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias, así como muestras de constituyentes de cultivos celulares in vitro, incluidos, entre otros, medios acondicionados resultantes del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo células recombinantes y componentes celulares.

“Soporte sólido” quiere decir una matriz sólida a la que los polipéptidos del VHC usados en los inmunoensayos objeto están unidos covalentemente o por medios no covalentes, tales como adsorción hidrófoba.

“Inmunológicamente reactivo” o “inmunorreactivo” quiere decir que el antígeno en cuestión reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.

“Inmunogénico" quiere decir que el antígeno en cuestión producirá una reacción inmunitaria cuando se administre a un individuo.

“Complejo inmunitario” quiere decir la combinación formada cuando un anticuerpo se une a un epítopo sobre un antígeno.

Como se usa en el presente documento, los términos “marcador” y “marcador detectable” se refieren a una molécula capaz de ser detectada, incluidas, entre otras, isótopos radioactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, cromóforos, nanopartículas fluorescentes, colorantes, iones metálicos, soles metálicos, ligandos (p. ej., biotina, avidina, estreptavidina o haptenos) y similares. El término “fluorescente” se refiere a una sustancia o porción de la sustancia que es capaz de exhibir fluorescencia en la gama detectable. Ejemplos concretos de marcadores que se pueden usar con la invención incluyen, entre otros, peroxidasa de rábano (HRP), fluoresceína, FITC, rodamina, dansilo, umbeliferona, éster de dimetilacridinio (DMAE), rojo Texas, NADPH, α-β-galactosidasa.

II. Modos de llevar a cabo la invención

Antes de describir con detalle la presente invención debe entenderse que la presente invención no se limita a formulaciones concretas o parámetros de procedimientos concretos, ya que todos pueden, por supuesto, variar. Se entenderá también que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir sólo realizaciones particulares de la invención y no se desea que sea limitante.

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

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención se basa en el descubrimiento de nuevos MEFA del VHC con sitios de escisión para la NS3 proteasa de modo que se inhibe la escisión proteolítica del MEFA modificado por la NS3 proteasa del VHC. Dichos MEFA modificados son especialmente útiles en procedimientos diagnósticos para detección precisa y precoz de la infección por VHC. Los MEFA modificados incluyen varios polipéptidos del VHC, bien de los mismos o de diferentes genotipos y aislamientos del VHC, tal como múltiples epítopos inmunodominantes, por ejemplo epítopos lineales principales del núcleo del VHC, SECUENCIAS E1, E2, NS3, NS4, 5-1-1, c100-3 y NS5.

Los MEFA modificados se pueden usar en inmunoensayos solos o en combinación con otros antígenos del VHC, preferentemente en combinación con epítopos conformacionales altamente inmunogénicos derivados de la región NS3/4a de la poliproteína del VHC. Los inmunoensayos se pueden usar para detectar infección por VHC durante las primeras etapas de la seroconversión del VHC, incrementando de este modo la precisión de la detección y reduciendo la incidencia de resultados falsos. Los procedimientos se pueden poner en práctica de forma conveniente en un ensayo sencillo usando

cualquiera de los diversos formatos de ensayo que se describen más adelante, tales como, entre otros, formatos de ensayos que usan un soporte sólido al que se unen los antígenos del VHC.

Con el fin de entender adicionalmente la invención se proporciona una discusión más detallada con respecto a MEFA modificados, epítopos NS3/4a conformacionales del VHC, así como producción de las proteínas y procedimientos de usar las proteínas.

MEFA del VHC

Los genomas de las cepas del VHC contienen un único marco de lectura abierto de aproximadamente 9.000 a 12.000 nucleótidos que se transcriben en una poliproteína. Como se muestra en la Figura 1 y la Tabla 1, una poliproteína del VHC, tras escisión, produce al menos diez productos distintos, en el orden siguiente:

NH2-Núcleo-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. El polipéptido del núcleo se produce en las posiciones 1-191, numerados en relación con el VHC-1 (véase, Choo y col. (1991) Proc. Natl. Acad Sci. Documento USA 88:2451-2455, el genoma del VHC-1). Este polipéptido se procesa después para producir un polipéptido del VHC con aproximadamente 1-173 aminoácidos, Los polipéptidos de la cubierta, E1 y E2, se producen aproximadamente en las posiciones 192-383 y 384-746, respectivamente. El dominio P7 se encuentra aproximadamente en las posiciones 747-809. NS2 es una proteína integral de la membrana con actividad proteolítica y se encuentra aproximadamente en las posiciones 810-1026 de la poliproteína. NS2, en combinación con NS3, (encontrada aproximadamente en las posiciones 1027-1657), escinde el enlace SISSLE NS2-NS3 que, a su vez, genera el extremo NS3 N y libera una poliproteína grande que incluye las actividades serina proteasa y ARN helicasa. La proteasa NS3, que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1027-1207, sirve para procesar el resto de la poliproteína. La actividad helicasa se encuentra aproximadamente en las posiciones 1193-1657 ("dominio helicasa"). NS3 libera un cofactor de NS3 (NS4a, que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1658-1711), dos proteínas (NS4b, que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1712-1972, y NS5a que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1973-2420), y una ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5b, que se encuentra aproximadamente en las posiciones 2421-3011). La terminación de la maduración de la poliproteína se inicia mediante escisión autocatalítica en la unión NS3-NS4a, catalizada por la NS3 serina proteasa.

Tabla 1	
Dominio	Límites aproximados*
C (núcleo)	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711
NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011
*Numerado con respecto al VHC-1. Vease Choo y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455.	

Se han determinado las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de una serie de cepas y aislamientos de VHC, incluidas las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de las diversas regiones de la poliproteína del VHC, incluidos los genes y polipéptidos del Núcleo, NS2, p7, E1, E2, NS3, NS4, NS5a, NS5b.

Las publicaciones que describen los aislamientos del VHC-1 incluyen Choo y col. (1990) Brit. Med. Bull. 46:423-441; Choo

y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455 y Han y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1711-1715. Los aislamientos del VHC HC-J1 y HC-J4 se describen en Okamoto y col. (1991) Japan J. Exp. Med 60:167-177. Los aislamientos del VHC HCT 18~, HCT 23, Th, HCT 27, EC1 y EC 10 se describen en Weiner y col. (1991) Virol. 180:842-848. Los aislamientos del VHC Pt-1, HCV-K1 y HCV-K2 se describen en Enomoto y col. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 170:1021-1025. Los aislamientos del VHC A, C, D y E se describen en Tsukiyama-Kohara y col. (1991) Virus Genes 5:243-254. El aislamiento del VHC J1.1 se describe en Kubo y col. (1989) Japan. Nucl. Acids Res. 17:10367-10372; Takeuchi y col. (1990) Gene 91:287-291; Takeuchi y col. (1990) J. Gen. virol. 71:3027-3033; y Takeuchi y col. (1990) Nucl. Acids Res. 18:4626. Las secuencias codificadoras completas de dos aislamientos independientes, HCV-J y BK, se describen en Kato y col., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9524-9528 y Takamizawa y col., (1991) J. Viol 65:1105-1113 respectivamente.

Como se ha explicado anteriormente, la divulgación atañe a antígenos de fusión de múltiples epítopos (MEFA) modificados para uso en inmunoensayos para la detección del VHC. Los MEFA modificados incluyen múltiples epítopos del VHC derivados de cualquiera de las diversas regiones virales del VHC mostradas en la Figura 1 y la Tabla 1, y como se describe adicionalmente más adelante. Normalmente, los MEFA modificados incluyen al menos 3 epítopos, preferentemente 3-25 o más epítopos, por ejemplo al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 epítopos o más, tal como 10-20 epítopos, derivados de al menos 3 regiones diferentes de la poliproteína del VHC, más normalmente de 4-10 regiones de la poliproteína del VHC, tal como de 5-8, por ejemplo 5, 6, 7, 8, regiones de la poliproteína del VHC. Los MEFA modificados incluirán al menos un epítopo modificado del dominio helicasa y, preferentemente, epítopos de NS4a/NS4b y/o NS5a. Los MEFA modificados pueden también incluir secuencias que no sean del VHC, tal como secuencias que ayudan en la expresión recombinante del MEFA, incluidas las secuencias de la superóxido dismutasa, como se describe adicionalmente más adelante.

En el MEFA modificado, los múltiples antígenos del VHC están dispuestos como una única cadena continua de aminoácidos, cadena que no se produce como tal en la naturaleza. Por tanto, el orden lineal de los epítopos es diferente del orden lineal de estos epítopos en el genoma en el que se producen. El orden lineal de las secuencias de los MEFA modificados para uso en el presente documento se dispone, preferentemente, para antigeneicidad óptima. Preferentemente, los epítopos proceden de más de una cepa del VHC, tal como de 2, 3, 4, 5, 6 o más cepas, de modo que proporcionan la capacidad añadida de detectar múltiples cepas del VHC en un único ensayo. Adicionalmente, los polipéptidos presentes en el MEFA se pueden seleccionar en base a los clados virales concretos endémicos de regiones geográficas específicas en las que se usarán los inmunodiagnósticos. Es fácilmente evidente que dichos MEFA proporcionan un modo eficaz de diagnosticar la infección por VHC en una amplia variedad de contextos. Además, el uso de MEFA modificados garantiza que no se producirá la escisión proteolítica del MEFA por la NS3 proteasa, de modo que se proporcionan mejores reactivos para usar en inmunoensayos del VHC.

Los MEFA modificados de la invención están mutados en los sitios de escisión proteolítica de NS3 de modo que la escisión del MEFA modificado por NS3 se inhibe. Los sitios de escisión proteolítica de NS3 se encuentran en los sitios de unión NS3/4a, NS4a/4b, NS4b/5a y NS5a/5b (Grakoui y col., J. Virol. (1993) 67:2832-2843). Por tanto, en referencia a la Tabla 1, estos sitios se producen en las posiciones 1657/1658, 1711/1712, 1972/1973 y 2420/2421, respectivamente, numerados respecto a la secuencia de poliproteína del VHC-1. Además, los sitios de escisión también se producen dentro del dominio de la helicasa de NS3 en las posiciones 1428/1429 y 1455/1456, numerados respecto a la secuencia de poliproteína del VHC-1. Un experto en la técnica puede determinar sitios adicionales para modificación en base a la estructura y función conocidos de la proteasa NS3 del VHC como se describe en, por ejemplo, De Francesco y col., Antivir. Ther. (1998) 3:99-109; y Schechter y Berger, Biochim. Biophys. Res. Commun. (1967) 27: 157-162.

De acuerdo con la presente divulgación, el MEFA se puede modificar mediante deleción de todos o algunos de los sitios de escisión proteolítica de NS3. Como alternativa, la escisión proteolítica por la proteasa NS3 se puede inhibir mediante sustitución de los aminoácidos dentro de los sitios de escisión proteolítica de modo que los sitios no actúen como sustrato para la proteasa NS3. Por último, las adiciones de aminoácidos de modo que el sitio de escisión proteolítica se modifique para que la NS3 proteasa no actúe sobre él también servirán para inhibir la actividad proteolítica. Asimismo, en los epítopos encontrados en los MEFA de la divulgación puede haber, aunque no es necesario, modificaciones adicionales que no afecten a la escisión proteolítica. Como será evidente respecto al uso del MEFA modificado, ninguna modificación para eliminar los sitios de escisión de la proteasa afectará a la inmunorreactividad del MEFA modificado de este modo.

Por tanto, por ejemplo, uno o más de los aminoácidos en uno o más de los sitios anteriores, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o todos estos aminoácidos, se pueden sustituir o eliminar con el fin de retrasar la escisión proteolítica del MEFA por la proteasa NS3. Como alternativa, se pueden realizar adiciones en estos sitios de escisión con el fin de inhibir la escisión por la proteasa NS3.

En ciertos aspectos de la divulgación, cada uno de los aminoácidos en todos los sitios de escisión proteolítica presentes en el MEFA están modificados con el fin de prevenir la escisión por la NS3 proteasa. Por tanto, si el MEFA incluye uno o más epítopos que abarcan los sitios de escisión en el dominio helicasa, la unión NS3/4a, la unión NS4a/NS4b, etc., los aminoácidos que definen los sitios estarán sustituidos o modificados. Sustituciones concretas para sitios en el dominio

helicasa incluyen una sustitución del aminoácido Thr por Leu que normalmente se produce en la posición 1428 de la poliproteína del VHC-1; una sustitución de Ser por Pro que normalmente se produce en la posición 1429 de la poliproteína del VHC-1; una sustitución de Asn por Leu que normalmente se produce en la posición 1455 de la poliproteína del VHC-1; una sustitución de Thr por Pro que normalmente se produce en la posición 1456 de la poliproteína del VHC-1. Sustituciones concretas en la unión NS3/4a incluyen una sustitución de Thr por Leu que normalmente se produce en la posición 1657 de la poliproteína del VHC-1; una sustitución de Ser por Pro que normalmente se produce en la posición 1658 de la poliproteína del VHC-1. Debe entenderse que los aminoácidos indicados anteriormente en estas posiciones están con referencia a la secuencia del VHC-1 y que el MEFA puede también incluir epítopos de los dominios helicasa y NS3/4a de cualquiera de los otros genotipos del VHC que pueden o no tener los mismos aminoácidos en estas posiciones, en cuyo caso el aminoácido correspondiente se sustituiría con un aminoácido que sirve para inhibir la escisión proteolítica del MEFA por la NS3.

Además, un experto en la técnica puede determinar fácilmente otras modificaciones adecuadas de aminoácidos en estos sitios en base a la estructura y función conocidos de la proteasa NS3 del VHC como se describe en, por ejemplo, De Franceco y col., Antivir. Ther. (1998) 3:99-109; y Schechter y Berger, Biochim. Biophys. Res. Commun. (1967) 27:157-162. En concreto, se sabe que la proteasa NS3 es una serina proteasa y el mecanismo proteolítico se basa en el ataque nucleofílico del enlace peptídico dirigido por una serina. Las cadenas laterales alineadas de serina, histidina y aspartato forman la tríada analítica común a la mayoría de las serina proteasas. El sitio activo de las serina proteasas tiene forma de hendidura en la que se une el sustrato polipeptídico. Schechter y Berger, Biochim. Biophys. Res. Commun. (1967) 27:157-162 marcaron los residuos de aminoácidos desde el extremo N al C del sustrato polipeptídico (Pi, ..., P3, P2, P1, P1', P2', P3', ..., Pj) y sus subsitios de unión respectivos (Si,..., S3, S2, S 1, S1', S2', S3',..., Sj) y descubrieron que la escisión se cataliza entre Pal y P1'. La NS3 proteasa adopta un pliegue similar al de la quimotripsina e incluye un sitio muy largo de unión al sustrajo expuesto al disolvente, consistente con el requisito de sustratos peptídicos muy largos (P6-P4'). La proteasa NS3 tiene preferencia por los residuos de cisteína en la posición del sustrato P1. Por tanto, en base a la estructura y función conocidas como se ha descrito anteriormente y en la técnica, un experto en la técnica puede determinar fácilmente otras sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos que servirán para romper los sitios de escisión proteolítica para la proteasa NS3 y, por tanto, producir un MEFA menos susceptible a la escisión.

Sustituciones concretas en la unión NS4a/4b, encontradas en el epítopo 5-1-1, si están presentes en el MEFA, incluyen una sustitución de Cys por Pro, que normalmente se produce en la posición 1711 de la poliproteína del VHC-1 y una sustitución de Ser por Ile que normalmente se produce en la posición 1712 de la poliproteína del VHC-1. El epítopo 5-1-1 se encuentra en aproximadamente las posiciones 1694-1735, numeradas con respecto a la secuencia de la poliproteína del VHC-1. Debe entenderse que los aminoácidos indicados anteriormente en estas posiciones están con referencia a la secuencia del VHC-1 y que el MEFA puede también incluir, y preferentemente lo hace, epítopos de los dominios 5-1-1 e cualquiera de los otros genotipos del VHC que pueden o no tener los mismos aminoácidos en estas posiciones, en cuyo caso el aminoácido correspondiente se sustituiría con un aminoácido que sirva para inhibir la escisión proteolítica del MEFA por la NS3. Por ejemplo, los aminoácidos nativos en las posiciones 1711 y 1712 del VHC-2 son los mismos que los encontrados en el VHC-1. El aminoácido en la posición 1711 del VHC-2 es el mismo que en VHC-1 y VHC-3. No obstante, el aminoácido de la posición 1712 del VHC-2 es Ala. Esta Ala puede estar sustituida con, por ejemplo, Ile, con el fin de inhibir la escisión proteolítica del MEFA por la NS3. Además, un experto en la técnica puede determinar fácilmente otras modificaciones de aminoácidos adecuadas en estos sitios en base a la estructura y función conocidas de la proteasa NS3 del VHC como se describe en, por ejemplo, De Franceco y col., Antivir. Ther. (1998) 3:99-109; y Schechter y Berger, Biochim. Biophys. Res. Commun. (1967) 27:157-162.

Como se ha explicado anteriormente, los MEFA de la presente divulgación incluyen al menos uno o más epítopos derivados de las regiones NS3 y NS4a (bien lineal o conformacional), tal como de las regiones de helicasa y/o proteasa de NS3. Por tanto, el MEFA puede incluir múltiples epítopos inmunodominantes derivados de la región NS3/4a de uno o más aislamientos del VHC. Si se usan múltiples epítopos de NS3/4a en la fusión de múltiples epítopos, pueden ser epítopos iguales o diferentes. Como alternativa, el antígeno de fusión puede incluir uno o más epítopos derivados de la región NS3/4a, así como epítopos lineales principales de otras regiones del VHC tales como, sin limitaciones, secuencias del núcleo del VHC, E1, E2, P7, NS4b, NS5a y NS5b.

Los polipéptidos que comprenden epítopos derivados de la región NS3/4a incluyen, sin limitaciones, polipéptidos que comprenden toda o una porción de las regiones NS3, NS4a y NS3/4a, y pueden incluir epítopos del dominio helicasa y/o proteasa de NS3. Se conoce una serie de epítopos de estas regiones, incluidos, entre otros, antígenos derivados de las regiones c33c, c200 y c100, así como proteínas de fusión que comprenden un epítopo NS3, tal como c25. Éstos y otros epítopos de NS3 son útiles en los presentes MEFA y se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Houghton y col., patente de EE.UU. nº 5.350.671; Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien y col., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:533-39; Chien y col., publicación internacional Nº WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional Nº WO 94/01778; y las patentes de EE.UU. nº 6.346.375 y 6.150.087.

Además, el determinante antigénico conocido como 5-1-1 está parcialmente dentro de la región NS4a (véase la Figura 1) y es particularmente útil en los MEFA para uso en los ensayos objeto. El epítopo 5-1-1 se encuentra en aproximadamente

las posiciones 1694-1735, numeradas con respecto a la secuencia de la poliproteína del VHC-1. Este determinante antigénico aparece en formas diferentes sobre VHC-1, VHC-2 y VHC-3. De acuerdo con esto, en ciertos aspectos de la divulgación, todas estas formas de 5-1-1 aparecen en el antígeno de fusión de múltiples epítopos usado en los inmunoensayos objeto.

Los MEFA modificados también pueden incluir epítopos de la región central de cualquiera de los diversos aislamientos del VHC. Esta región se produce en las posiciones de aminoácidos 1-191 de la poliproteína del VHC, numerados respecto al VHC-1. En los MEF objeto pueden estar presentes la proteína de longitud completa, fragmentos de la misma, tales como los aminoácidos 1-150, por ejemplo los aminoácidos 1-130, 1-120, por ejemplo los aminoácidos 1-121, 1-122, 1-123, etc., o fragmentos más pequeños que contienen epítopos de la proteína de longitud completa, tales como los epítopos que se encuentran entre los aminoácidos 9-32, 10-53, 10-45, 39-42, 64-88, 67-84, 67-88, 120-130, o cualquiera de los epítopos centrales identificados en, por ejemplo, Houghton y col., patente de EE.UU. nº 5.350.671; Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien y col., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:533-39; Chien y col., publicación internacional nº WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional nº WO 94/01778; y patentes de EE.UU. nº 6.280.927 y 6.150.087. Además, se puede usar una proteína resultante de un cambio de marco de lectura en la región central de la poliproteína, tal como se describe en la publicación internacional nº WO 99/63941.

De forma similar, los polipéptidos de las regiones E1 y/o E2 del VHC se pueden usar en los MEFA modificados. E2 existe como múltiples especies (Spaete y col., Virol. (1992) 188:819-830; Selby y col., J. Virol. (1996) 70:5177-5182; Grakoui y col., J. Viol (1993) 67:1385-1395; Tomei y col., J. Virol. (1993) 67:4017-4026) y se pueden producir cortes y proteólisis en los extremos N y C del polipéptido E2. Por tanto, un polipéptido E2 para usar en el presente documento puede comprender proteínas inmunogénicas de longitud completa y truncadas en los extremos N y/o C, tales como proteínas que tienen los aminoácidos 405-661, por ejemplo, 400,401,402... en 661, por ejemplo 405-444, 383 o 384-661, 383 o 384-715, 383 o 384-746, 383 o 384-749 o 383 o 384-809, o 383 o 384 en cualquier extremo C entre 661-809 de una poliproteína del VHC, numerados con respecto a la poliproteína de longitud completa del VHC-1. Epítopos del VHC adicionales para uso en los MEFA incluyen epítopos derivados de la región hipervariable de E2, tal como una región que abarque los aminoácidos 384-414 o 390-410, o la secuencia consenso de esta región, Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn (SEC ID Nº 7), que representa una secuencia consenso para los aminoácidos 390-410 del genoma del VHC de tipo 1. Un epítopo de E2 representativo en un MEFA de la divulgación puede comprender un epítopo híbrido que abarque los aminoácidos 384-414. Dicho epítopo de E2 híbrido puede incluir una secuencia consenso que representa los aminoácidos 390-410 condensados a una secuencia consenso de una segunda cepa. Como alternativa, el epítopo de E2 presente puede comprender un epítopo híbrido que abarca los aminoácidos 390-444. Dicho epítopo de E2 híbrido puede incluir una secuencia consenso que representa los aminoácidos 390-410 como se ha detallado anteriormente condensado a, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos nativa para los aminoácidos 411-444 para E2 del VHC.

Adicionalmente, los MEFA modificados pueden incluir los polipéptidos E1, tales como epítopos que comprenden los aminoácidos 192-326, 192-330, 192-333, 192-360, 192-363, 192-383, o 192 en cualquier extremo C entre 326-383, de una poliproteína del VHC, tal como un epítopo E1 que incluye los aminoácidos 303-320.

Como se ha explicado anteriormente, los antígenos pueden derivar de varias cepas del VHC. Se conocen múltiples cepas virales del VHC y se pueden usar los epítopos derivados de cualquiera de estas cepas en una proteína de fusión. Se sabe bien que cualquier especie de organismo dada varía de un organismo individual a otro y, además, que un organismo dado, tal como un virus, puede tener una serie de cepas diferentes. Por ejemplo, como se ha explicado anteriormente, el VHC incluye al menos 6 genotipos. Cada uno de estos genotipos incluye determinantes antigénicos equivalentes. Más específicamente, cada cepa incluye una serie de determinantes antigénicos que están presentes en todas las cepas del virus, pero que son ligeramente diferentes de una cepa viral a otra. Por ejemplo, el VHC incluye el determinante antigénico conocido como 5-1-1 (véase la Figura 1). Como se ha explicado anteriormente, este determinante antigénico concreto aparece en formas diferentes sobre VHC-1, VHC-2 y VHC-3. De acuerdo con esto, en ciertos aspectos de la divulgación, todas estas formas de 5-1-1 aparecen en el antígeno de fusión de múltiples epítopos usado en los inmunoensayos objeto. De forma similar, puede también haber determinantes antigénicos equivalentes de la región del núcleo de diferentes cepas de VHC. En general, los determinantes antigénicos equivalentes tienen un grado alto de homología en términos de secuencia de aminoácidos cuyo grado de homología es, en general, 30 % o más, preferentemente 40 % o más, cuando están alineados. El epítopo de múltiples copias de la presente divulgación también puede incluir múltiples copias que son copias exactas del mismo epítopo.

La figura 8 muestra un MEFA representativo modificado, denominado en el presente documento “MEFA 7.2”. No obstante, debe entenderse que otros epítopos derivados del genoma del VHC también encontrarán utilidad en los MEFA modificados de la divulgación. El MEFA parental que formó el molde para el MEFA 2 fue "MEFA 7.1." El mapa del MEFA 7.1 y las secuencias de ADN y aminoácidos correspondientes del MEFA 7.1 se muestran en las Figuras 4 y 5A-5F, respectivamente. El MEFA 7.1 se describe con detalle en la patente de EE.UU. nº 6.632.601. En las figuras 10A-10B se realiza una comparación de las secuencias de aminoácidos de MEFA 7.1 y MEFA 7.2, con las diferencias entre las dos construcciones destacadas en negrita. Todas las diferencias se producen en los sitios de escisión proteolítica detallados

anteriormente. Por tanto, las mutaciones numeradas respecto a la secuencia de MEFA se producen en las posiciones 466, 467, 493, 494, 695, 696, 721, 722, 770, 771, 819 y 820 de las figuras 10A-10B. Estas posiciones de aminoácidos corresponden a las posiciones 1428, 1429, 1455, 1456, 1657, 1658, 1711, 1712, 1711, 1712, 1711 y 1712 (debido a las tres repeticiones de 5-1-1), respectivamente, numerados respecto a la secuencia de poliproteínas del VHC-1.

La secuencia de ADN y la correspondiente secuencia de aminoácidos de MEFA 7.2 se muestran en las Figuras 9A-9F. La fórmula estructural general de MEFA 7.2 se muestra en la figura 8 y es la siguiente: hSOD-E1(tipo 1)-E2 HVR consenso (tipo 1a)-E2 HVR consenso (tipos 1 y 2)-helicasa mutada (tipo 1)-5-1-1 mutado (tipo 1)-5-1-1 mutado (tipo 3)-5-1-1 mutado (tipo 2)-c100(tipo 1)-NS5(tipo 1)-NS5(tipo 1)-epítopos del núcleo (tipos 1+2)-epítopos del núcleo (tipos 1+2). Este MEFA incluye la siguiente secuencia de aminoácidos, numerada con respecto al VHC-1 (la numeración de los aminoácidos que se indica a continuación sigue la designación de numeración proporcionada en Choo y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455, en la que el aminoácido nº 1 es la primera metionina codificada por la secuencia de codificación de la región del núcleo): Los aminoácidos 1-156 de la superóxido dismutasa (SOD, usada para potenciar 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 del VHC-1aE2; los aminoácidos 384 a 414 de la poliproteína de la región E2, que representan una secuencia consenso para las regiones hipervariables E2 del VHC-1 y VHC-2; los aminoácidos 1193-1658 de la poliproteína del VHC-1 que define la helicasa, con mutaciones en los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1428, 1429, 1455, 1456, 1657 y 1658 de la poliproteína (aminoácidos 466, 467, 493, 494, 695 y 696, numerados respecto a la secuencia del MEFA mostrada en las Figuras 9A-9F); tres copias de un epítopo de 5-1-1, los aminoácidos 1689-1735, uno del VHC-1, uno del VHC-3 y uno del VHC-2, copias que son determinantes antigénicos equivalentes de las tres cepas virales diferentes del VHC y cada una de las cuales tiene mutaciones en los aminoácidos correspondientes a 1711 y 1712 de la poliproteína (aminoácidos 721, 722, 770, 771, 819 y 820, numerados respecto a la secuencia del MEFA mostrada en las Figuras 9A-9F); el polipéptido C100 del VHC del VHC-1, los aminoácidos 1901-1936 de la poliproteína; dos copias exactas de un epítopo de la región NSS del VHC-1, cada una con los aminoácidos 2278 a 2313 de la poliproteína del VHC; y dos copias exactas de varios epítopos de la región del núcleo, una del VHC-1 y una del VHC-2, copias que son determinantes antigénicos equivalentes representados por los aminoácidos 9 a 32, 39-42 y 64-88 del VHC-1 y 67-84 del VHC-2.

La Tabla 2 muestra las posiciones de los aminoácidos de los diversos epítopos con referencia a las Figuras 9A-9F en el presente documento.

Tabla 2. MEFA 7.2

MEFA nº aa	Sitio en extremo 5'	epítopo	VHC nº aa	Cepa
1-156	*Nco*1	hSOD		
159-176	*EcoR*I	E1	303-320	1
179-199	*Hind*III	E2 HVR1 consenso	390-410	1
200-230	*Hind*III	E2 HVR1 + 2 consenso	384-414	1+2
231-696	*Sal*1	Mutantes helicasa 3 LP	1193-1658	1
699-745	*Sph*1	5-1 1 Pl mut	1689-1735	1
748-794	*Nru*1	5-1 1 Pl mut	1689-1735	3
797-843	*Cla*1	5-1 1 Pl mut	1689-1735	2
846-881	*Ava*1	C100	1901-1936	1
884-919	*Xba*1	NS5	2278-2313	1
922-957	*Bgl*11	NS5	2278-2313	1
958-1028	*Nco*1	Epítopos del núcleo	9-32, 39-42 64-88 67-84	1 1 2

1029-1099	*Bal*1	Epítopos del núcleo	9-32, 39-42	1
			64-88	1
			67-84	2

Por tanto, un MEFA modificado concreto está representado por MEFA 7.2. También se desean MEFA que muestren una homología sustancial con MEFA 7.2, como se ha definido anteriormente. Dichos MEFA pueden tener secuencias que exhiban al menos aproximadamente 50 %, preferentemente al menos aproximadamente 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente 80-85 %, preferentemente al menos aproximadamente 90 % y más preferentemente al menos aproximadamente 95 %-98 % de identidad de secuencia a lo largo de toda la longitud de las moléculas, siempre que siga habiendo al menos una modificación en los sitios de escisión proteolítica y, preferentemente, todas las modificaciones en los sitios de escisión proteolítica, y los MEFA sean inmunorreactivos y, por tanto, útiles en los inmunodiagnósticos del VHC como se ha descrito en el presente documento.

Como se ha explicado anteriormente, el MEFA 7.2 se preparó usando MEFA 7.1 como molde. No obstante, otros numerosos MEFA conocidos se pueden modificar como se ha descrito anteriormente, para proporcionar MEFA modificados adicionales con menor susceptibilidad a la escisión proteolítica por NS3, los MEFA que se pueden modificar como se describe en el presente documento incluyen MEFA-3, MEFA-5 y MEFA-6, representados en las Figures 12A, 12B y 12C, respectivamente, y se describen en las publicaciones internacionales nº WO 01/96875, WO 01/09609, WO 97/44469 y las patentes de EE.UU nº 6,514,731 and 6,428,792. Por ejemplo, la disposición de la secuencia del epítopo del MEFA 6 es similar a la del MEFA 7.2. No obstante, el MEFA 7.2 incorpora la región hipervariable E2 (HVR) y la secuencia consenso E2 HVR 1+2. Adicionalmente, la totalidad de la región de la helicasa de NS3 está incluida en el MEFA 7.2. Por tanto, el MEFA 7.2 es considerablemente más grande que el MEFA 6, con un peso molecular de aproximadamente 120 kDa. No obstante, el nivel de expresión en levaduras es similar al de MEFA 6, y se puede purificar hasta una pureza superior al 95 % y es escalable.

Los MEFA modificados se usan solos o, preferentemente, en combinación con otro antígeno del VHC, tal como cualquiera de las proteínas inmunogénicas del VHC descritas anteriormente con referencia a los MEFA. En realizaciones preferidas, el MEFA modificado se usa en combinación con un epítopo NS3/4a del VHC, preferentemente un epítopo conformacional, en inmunoensayos para detectar el virus del VCH. Por tanto, en una realización de la invención, representada en la Figura 2, se realiza un inmunoensayo de captura rápida de ligando usando un MEFA 7.2 y un epítopo NS3/4ª. La muestra se combina con los antígenos que pueden estar presentes sobre un soporte sólido, como se describe adicionalmente más adelante. Si la muestra está infectada por VHC, los anticuerpos frente a dichos epítopos presentes sobre el soporte sólido se unirán a los componentes de soporte sólido. La detección se realiza mediante la fijación de un marcador detectable (tal como peroxidasa de rábano (HRP) como se muestra en la Figura 2) a un miembro del complejo antígeno/anticuerpo. La fijación se puede realizar por medios covalentes o mediante la posterior unión de anticuerpos marcados de forma detectable, o antígenos conocidos, tales como en un ensayo de tipo sándwich estándar, O mediante reacción enzimática cuyo producto es detectable. El marcador detectable puede incluir, entre otros, un cromóforo, un anticuerpo, un antígeno, una enzima, un compuesto reactivo a la enzima cuyo producto de escisión es detectable, rodamina o derivado de rodamina, biotina, avidina, estreptavidina, un compuesto fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, tal como éster de dimetilacridinio (DMAE, Ciba Corning Diagnostics Corp.), derivados y/o combinaciones de estos marcadores. Convenientemente se puede usar un anticuerpo anti-humano marcado de forma detectable, capaz de detectar una molécula de IgG humana presente. Como alternativa, se puede usar un antígeno del VHC marcado de forma detectable, por ejemplo un NS3/4a o un MEFA.

Epítopos conformacionales NS3/4a del VHC

Como se ha explicado anteriormente, es particularmente preferido para usar los MEFA modificados de la invención en inmunoensayos en combinación con un epítopo de la región NS3/4a. Se ha descrito la región NS3/4a de la poliproteína del VHC y la secuencia de aminoácidos y la estructura global de la proteína se divulgan en, por ejemplo, Yao y col., Structure (November 1999) 7:1353-1363; Sali y col., Biochem. (1998) 37:3392-3401; y Bartenschlager, R, J. Viral Hepat. (1999) 6:165-181. Véase, también, Dasmahapatra y col., la patente de EE.UU. Nº 5.843.752. Los inmunoensayos objeto pueden usar al menos un epítopo conformacional derivado de la región NS3/4a que existe en la conformación como se encuentra en la partícula del VHC natural o su producto infeccioso, como se pone de manifiesto mediante la conservación de la proteasa y, opcionalmente, las actividades enzimáticas de helicasa normalmente mostradas por el producto génico de NS3/4a y/o mediante mantenimiento de la inmunorreactividad del antígeno con anticuerpos en una muestra biológica de un sujeto infectado por el VHC y una pérdida de la inmunorreactividad del epítopo tras la desnaturalización del antígeno. Por ejemplo, el epítopo conformacional se puede romper calentando, cambiando el pH a extremadamente ácido o básico, o añadiendo desnaturalizantes orgánicos conocidos, tales como ditiotreitol (DTT) o un detergente adecuado. Véase, por ejemplo, Protein Purification Methods, a practical approach (E.L.V. Harris y S. Angal eds., IRL Press) y el producto desnaturalizado comparado con el producto que no se trata como anteriormente.

La actividad proteasa y helicasa se puede determinar usando ensayos enzimáticos estándar bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad proteasa se puede determinar usando ensayos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Takeshita y col., Anal. Biochem. (1997) 247:242-246; Kakiuchi y col., J. Biochem. (1997) 122:749-755; Sali y col., Biochemistry (1998) 37:3392-3401; Cho y col., J. Virol. Meth. (1998) 72:109-115; Cerretani y col., Anal. Biochem. (1999) 266:192-197; Zhang y col., Anal. Biochem. (1999) 270:268-275; Kakiuchi y col., J. Virol. Meth. (1999) 80:77-84; Fowler y col., J. Biomol. Screen. (2000) 5:153-158; y Kim y col., Anal. Biochem. (2000) 284:42-48. Un ensayo particularmente conveniente para analizar la actividad proteasa se establece en los ejemplos siguientes.

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

Si se usa un epítopo conformacional de NS3/4a, la longitud del antígeno es suficiente para mantener un epítopo conformacional inmunorreactivo. A menudo, el polipéptido que contiene el antígeno usado tendrá casi toda la longitud, no obstante, el polipéptido puede también truncarse para, por ejemplo, incrementar la solubilidad o mejorar la secreción. En general, el epítopo conformacional que se encuentra en NS3/4a se expresa como un polipéptido recombinante en una célula y este polipéptido proporciona el epítopo en una forma deseada, como se describe con detalle más adelante.

Una secuencia de aminoácidos representativa para un polipéptido de NS3/4a se muestra en las Figuras 13A a 13D. La secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 2-686 de la Figuras 13A a 13D corresponde a las posiciones de los aminoácidos 1027-1711 del VHC-1. Un codón iniciador (ATG) que codifica Met se muestra en la posición 1. Adicionalmente, la Thr que normalmente está en la posición 1428 del VHC-1 (posición de aminoácido 403 de la Figura 13) está mutada en Pro y la Ser que normalmente está en la posición 1429 del VHC-1 (posición de aminoácido 404 de la Figura 13) está mutada en Ile. Este epítopo conformacional NS3/4a se ha denominado "NS3/4a PI" y "NS3NS4a PI" en el presente documento. No obstante, ni la secuencia nativa, con o sin una Met en N-terminal, el análogo representado (es decir, el análogo "PI"), con o sin la Met en N-terminal, u otros análogos y fragmentos se pueden usar en los ensayos objeto, siempre que el epítopo se produzca usando un procedimiento que conserve o reinstaure su conformación nativa. Dasmahapatra y col., la patente de EE.UU. nº 5.843.752 y Zhang y col., la patente de EE.UU. nº 5.990.276, ambas describen análogos de NS3/4a.

La proteasa NS3 de NS3/4a se encuentra en aproximadamente las posiciones 1027-1207, numeradas con respecto al VHC-1, las posiciones 2-182 de la Figura 13. Se conocen la estructura de la proteasa NS3 y un sitio activo. Véase, por ejemplo, De Francesco y col., Antivir. Ther. (1998) 3:99-109; Koch et al., Biochemistry (2001) 40:631-640. Los cambios en la secuencia nativa que normalmente serán tolerados serán aquéllos fuera del sitio activo de la molécula. Particularmente, es deseable mantener los aminoácidos 1- o 2-155 de la Figura 13, con pocas o sólo sustituciones conservadoras. Los aminoácidos que están más allá de la posición 155 tolerarán cambios mayores. Adicionalmente, si se usan fragmentos de la secuencia NS3/4a, en general estos fragmentos incluirán al menos los aminoácidos 1- o 2-155, preferentemente los aminoácidos 1- o 2-175, y, más preferentemente, los aminoácidos 1- o 2-182, con o sin la Met del extremo N. El dominio de helicasa se encuentra aproximadamente en las posiciones 1193-1657 del VHC-1 (posiciones 207-632 de la Figura 13). Por tanto, si se desea la actividad helicasa, esta porción de la molécula se mantendrá con pocos o ningún cambio conservador. Un experto en la técnica puede determinar con facilidad otras regiones que tolerarán cambios en base a la estructura conocida de NS3/4a.

Como se ha explicado anteriormente, se conoce una serie de antígenos que incluyen epítopos derivados de NS3/4a, incluidos, entre otros, antígenos derivados de las regiones c33c, c200, c100 y 5-1-1 , así como proteínas de fusión que comprenden un epítopo NS3, tal como c25.

Para una descripción de éstos y otros varios epítopos de otras regiones del VHC, véase, por ejemplo, Houghton y col., patente de EE.UU. nº 5.350.671; Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien y col., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:533-39; Chien y col., publicación internacional Nº WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional Nº WO 94/01778; y las patentes de EE.UU. nº 6.280.927 y 6.150.087.

Producción de antígenos del VHC

Como se ha explicado anteriormente, las moléculas de la presente invención se producen, en general, de forma recombinante. Por tanto, los polinucleótidos que codifican antígenos del VHC para usar con la presente invención se pueden fabricar usando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, las secuencias polinucleotídicas que codifican las moléculas descritas anteriormente se pueden obtener usando procedimientos recombinantes, tales como

mediante detección selectiva de bibliotecas de ADNc y genómicas de células que expresan el gen o derivando el gen de un vector que se sabe que las incluye. Además, el gen deseado se puede aislar directamente de moléculas de ácido nucleico viral usando técnicas descritas en la técnica, tal como en Houghton y col., la patente de EE.UU. nº 5.350.671. El gen de interés también se puede producir sintéticamente en lugar de clonarse. Las moléculas se pueden diseñar con los codones adecuados para la secuencia concreta. Después, la secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapados preparados mediante procedimientos convencionales y reunidos en una secuencia codificadora completa. Véase, por ejemplo, Edge (1981) Nature 292:756; Nambair y col. (1984) Science 223:1299; y Jay y col. (1984) J. Biol. Chem. 259:6311.

Por tanto, se pueden obtener secuencias nucleotídicas concretas de vectores que alojan las secuencias deseadas o se pueden sintetizar completamente o en parte usando diversas técnicas de síntesis de oligonucleótidos conocidas en la técnica, tal como las técnicas de mutagénesis dirigida a sitio y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuando sea adecuado. Véase, por ejemplo, Sambrook, ant. En particular, un procedimiento de obtener secuencias nucleotídicas que codifican las secuencias deseadas es mediante hibridación de conjuntos complementarios de oligonucleótidos sintéticos solapantes producidos en un sintetizador automático convencional de nucleótidos, seguido de unión con una ADN ligasa adecuada y amplificación de la secuencia de nucleótidos ligada mediante PCR. Véase, por ejemplo, Jayaraman y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4084-4088. Adicionalmente, se pueden usar síntesis dirigida a oligonucleótidos (Jones y col. (1986) Nature 54:75-82), mutagénesis dirigida a oligonucleótidos de regiones nucleotídicas preexistentes (Riechmann y col. (1988) Nature 332:323-327 y Verhoeyan y col. (1988) Science 239:1534-1536), y llenado enzimático de huecos de oligonucleótidos usando la ADN polimerasa de T4 (Queen y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033) en la invención para proporcionar moléculas que tienen alterados los sitios de escisión proteolítica y/o menor susceptibilidad a la proteasa.

En la técnica se conocen procedimientos para producir MEFA y se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6,428,792; 6,514,731; 6,632,601; 6,797,809. Brevemente, el ADN que codifica los epítopos deseados para usar en el MEFA se produce sintéticamente o se obtiene a partir de vectores que lo incluyen, como se ha descrito anteriormente. Se pueden introducir sitios únicos para enzimas de restricción con el fin de conectar las secuencias que codifican los epítopos en el orden prescrito y potenciar la utilidad de la invención facilitando las modificaciones del diseño del MEFA. Un experto en la técnica de la tecnología de ADN recombinante determina fácilmente la elección de los sitios para enzimas de restricción y los procedimientos de clonación. Preferentemente, las uniones del epítopo (secuencias de aminoácidos creadas entre epítopos debido a la clonación) no generan epítopos inespecíficos. Los epítopos inespecíficos son, por ejemplo, secuencias que no son del VHC que no existen adyacentes a los epítopos del VHC en la naturaleza. Los epítopos inespecíficos se pueden unir a anticuerpos en una muestra de prueba produciendo resultados de ensayos falsos positivos. Para evitar interacciones inespecíficas con la MEFA debido a las secuencias de unión, la secuencia de ADN que codifica la unión puede, por ejemplo, mutarse de modo que se reducen las interacciones inespecíficas con la secuencia de aminoácidos mutantes y es posible la clonación de los fragmentos de epítopo. La secuencia de nucleótidos se introduce después dentro de un casete de expresión y un huésped adecuado se transforma con el casete. Se deja que el huésped exprese las secuencias para proporcionar el MEFA. A continuación, el MEFA producido se purifica mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad, procedimiento de se acelera en cierto grado debido a la presencia de las múltiples copias de un epítopo dado.

Los procedimientos para producir mutantes o análogos de la secuencia de nucleótidos deseada, tal como mutantes del VHC, son bien conocidos. Véase, por ejemplo, Dasmahapatra y col., la patente de EE.UU. nº 5.843.752, y Zhang y col., la patente de EE.UU. nº 5.990.276. Los mutantes y análogos de los antígenos del VHC para usar en inmunoensayos pueden prepararse mediante la deleción de una porción de la secuencia que codifica el polipéptido de interés, mediante inserción de una secuencia y/o mediante sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para modificar las secuencias de nucleótidos, tales como mutagénesis dirigida al sitio y similares. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., *ant.*; Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448; Geisselsoder y col. (1987) BioTechniques 5:786; Zoller y Smith (1983) Methods Enzymol. 100:468; Dalbie-McFarland y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci USA 79:6409.

Una vez que se han preparado o aislado las secuencias codificadoras, dichas secuencias se pueden clonar en cualquier vector adecuado o replicón. Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de clonación y la selección de un vector de clonación adecuado es cuestión de elección. Vectores adecuados incluyen, entre otros, plásmidos, fagos, transposones, cósmicos, cromosomas o virus, que son capaces de replicarse cuando están asociados con los elementos de control adecuados.

Después, la secuencia de codificación se introduce bajo el control de elementos de control adecuados en función del sistema que se va a usar para la expresión. Por tanto, la secuencia de codificación se puede introducir bajo el control de un promotor, sitio de unión al ribosoma (para expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador, de modo que la secuencia de ADN de interés se transcribe en ARN mediante un transformante adecuado. La secuencia codificadora puede o no contener un péptido señal o secuencia líder que después puede eliminarse mediante el procesamiento postraduccional del huésped. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 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 respecto al crecimiento de la célula huésped. Las secuencias reguladoras son conocidas para el experto en la técnica y entre los ejemplos se incluyen aquéllos que causan la expresión de un gen que se encenderá o apagará en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. Otros tipos de elementos reguladores también pueden estar presentes en el vector. Por ejemplo, en el presente documento se pueden usar elementos potenciadores para incrementar los niveles de expresión de las construcciones. Ejemplos incluyen el potenciador del gen temprano de SV40 (Dijkema y col. (1985) EMBO J. 4:761), el potenciador/promotor derivado de la repetición larga terminal (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Gorman y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777) y elementos derivados del CMV humano (Boshart y col. (1985) Cell 41:521), tales como los elementos incluidos en la secuencia del intrón A del CMV (patente de EE.UU. 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 de copias altas y un promotor fuerte.

Se construye un vector de expresión de modo que la secuencia codificadora concreta se localice en el vector con las secuencias reguladoras adecuadas, siendo la posición y orientación de la secuencia codificadora con respecto a las secuencias control tales que la secuencia codificadora se transcribe 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 codificadora). La modificación de las secuencias que codifican la molécula de interés puede ser deseable para conseguir este extremo. Por ejemplo, en algunos casos, puede ser necesario modificar la secuencia codificadora de modo que pueda unirse a las secuencias control con la orientación adecuada; es decir, para mantener el marco de lectura. Las secuencias control y otras secuencias reguladoras pueden unirse a la secuencia codificadora antes de la inserción en un vector. Como alternativa, la secuencia codificadora se puede clonar directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias control y un sitio de restricción adecuado.

Las moléculas se pueden expresar en una amplia variedad de sistemas, incluidos sistemas de expresión de insectos, mamíferos, bacterias, virus y levaduras, todos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los sistemas de expresión en células de insectos, tales como los sistemas de baculovirus, son conocidos para el experto en la técnica y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987). Materiales y procedimientos para los sistemas de expresión en células de insecto/baculovirus están disponibles comercialmente en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac"). De forma similar, los sistemas de expresión en bacterias y células de mamífero son bien conocidos en la técnica y se describe en, por ejemplo, Sambrook y col., ant. Los sistemas de expresión en levaduras también se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Yeast Genetic Engineering (Barr y col., eds., 1989) Butterworths, London.

También se conocen una serie de células huésped adecuadas con los sistemas anteriores. Por ejemplo, en la técnica se conocen líneas celulares de mamífero e incluyen líneas de células inmortalizadas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), tales como, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de riñón embrionario humano, células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), células de riñón bovino de MAdin-Darby ("MDBK"), además de otras. De igual forma, con los presentes constructos de expresión pueden encontrar utilidad huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp*. Las células huésped de levaduras útiles en la presente invención incluyen, entre otras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltase*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guillerimondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Entre las células de insecto para usar con los vectores de expresión de baculovirus se incluyen Aedes aegypti, Autographa californica, Bombyx mori, Drosophila melanogaster, Spodoptera frugiperda y Trichoplusia ni

Las moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias de nucleótidos de interés se pueden integrar de forma estable en el genoma de una célula huésped o se pueden mantener en un elemento episomal estable en una célula huésped adecuada usando varias técnicas de liberación génica bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.399.346.

Como se ha explicado anteriormente, con el fin de facilitar la expresión recombinante, la secuencia codificadora para MEFA se puede condensar con otra secuencia, tal como una fusión con, por ejemplo, una secuencia codificadora de la proteína de unión a maltosa de *E. coli* de 50 kDa, una fusión con una secuencia codificadora de una superóxido dismutasa (SOD) de levaduras o fragmento de la misma, o como una fusión con una secuencia codificadora de ubiquitina. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para la SOD humana se conocen y notifican en Hallewell y col., patente de EE.UU. nº 5.710,033

Según el sistema de expresión y el huésped seleccionado, las moléculas son producidas por células huésped en crecimiento transformadas por un vector de expresión descrito en lo que antecede en las condiciones en las que se expresa la proteína. La proteína expresada se aísla después en la célula huésped y se purifica. Si el sistema de expresó secreta la proteína en el medio de crecimiento, el producto se puede purificar directamente del medio. Si no se secreta, se puede aislar de lisados celulares. La selección de las condiciones de crecimiento adecuadas y los procedimientos de

recuperación están dentro de la experiencia en la técnica.

Se ha descrito la producción recombinante de varios antígenos del VHC, incluidos antígenos usados en las diversas fusiones descritas anteriormente. Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales Nº WO 94/01778, WO 93/00365, WO 04/00547 y WO 01/38360; las patentes de EE.UU. nº 5.350.671, 5.683.864, 6.346.375, 6.150.087, 6.514.731, 6.428.792 y 6.632.601; Chien y col., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chien, D.Y., publicación internacional nº WO 94/01778; Chien y col., Proc. Natl. Acad Sci. USA (1992) 89:10011-10015 .

Ensayos inmunodiagnósticos

Una vez que se han producido, los antígenos del VHC pueden usarse en casi cualquier formato de ensayo que usa un antígeno conocido para detectar anticuerpos. Una característica común a todos estos ensayos es que el antígeno se pone en contacto con el componente del cuerpo del que se sospecha que contiene anticuerpos del VHC en condiciones que permitan que el antígeno se una a cualquier anticuerpo presente en el componente. Dichas condiciones normalmente serán la temperatura fisiológica, pH y fuerza iónica usando un exceso de antígeno. A la incubación del antígeno con la muestra le sigue la detección de complejos inmunitarios formados con el antígeno.

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

El inmunoensayo puede ser, sin limitaciones, un formato heterogéneo u homogéneo, y de un tipo convencional o competitivo. En un formato heterogéneo, normalmente el antígeno se une a una matriz o soporte sólido para facilitar la separación de los complejos antígeno-anticuerpo de la muestra tras la incubación. Para los fines de la presente invención, un soporte sólido puede ser cualquier material que sea una matriz insoluble y puede tener una superficie rígida o semirígida. Ejemplos de soportes sólidos incluyen, entre otros, sustratos tales como nitrocelulosa (p. ej., en forma de membrana o pocillos de microtitulación; polivinilcloruro (p. ej., láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (p. ej., perlas o placas de microtitulación) fluoruro de polivinilideno; papel diazotizado; membranas de nylon; perlas activadas, perlas respondedoras magnéticamente, y similares. Soportes concretos incluyen placas, pastillas, discos, capilares, fibras huecas, agujas, alfileres, fibras sólidas, perlas de celulosa, perlas de vidrio poroso, geles de sílice, perlas de poliestireno opcionalmente reticuladas con divinilbenceno, perlas de copolímero injertado, perlas de poliacrilamida, perlas de látex, perlas de dimetilacrilamida opcionalmente reticuladas con N-N'-bis-acriloiletilendiamina y perlas recubiertas con un polímero hidrófobo.

Si se desea, las moléculas que se van a añadir al soporte sólido se pueden funcionalizar fácilmente para crear restos de estireno o acrilato, de modo que se permite la incorporación de las moléculas en poliestireno, poliacrilato u otros polímeros, tales como poliimida, poliacriamida, 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.

El antígeno no tiene que unirse directamente al soporte sólido sino que se puede unir de forma indirecta a través de, por ejemplo, otra molécula de unión. Por ejemplo, anticuerpos conocidos que se unen al antígeno se pueden biotinilar y combinar con un soporte sólido recubierto con estreptavidina o avidina. El antígeno de interés (p. ej., un MEFA o epítopo conformacional NS3/4a) se fija al soporte sólido uniéndose al anticuerpo biotinilado. Como alternativa, el antígeno de interés se puede biotinilar y combinar con un soporte sólido recubierto con estreptavidina o avidina.

Si en los ensayos se usa más de un antígeno del VHC, por ejemplo un MEFA modificado y un epítopo conformacional NS3/4a, los antígenos se pueden proporcionar sobre el mismo sustrato sólido o sobre diferentes sustratos sólidos que se combinan en el ensayo. Por tanto, por ejemplo, los antígenos pueden estar presentes en forma de entidades pequeñas sobre, por ejemplo, una placa, o puede estar presentes en forma de, por ejemplo, microperlas individuales que se añaden para el uso en el ensayo de interés.

En un contexto, como se representa en la Figura 2, primero se hace reaccionar un soporte sólido con los antígenos del VHC, por ejemplo MEFA 7.2 y NS3/4a del VHC (en conjunto denominados en el presente documento "los componentes de fase sólida") en condiciones de unión adecuadas de modo que las moléculas queden suficientemente inmovilizadas sobre el soporte. En ocasiones, la inmovilización sobre el soporte se puede potenciar acoplando primero el antígeno a una proteína con mejores propiedades de unión en fase sólida. Proteínas de acoplamiento adecuadas incluyen, entre otras, macromoléculas tales como seroalbúminas, incluida seroalbúmina bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina y otras proteínas bien conocidas para los expertos en la técnica. Otros reactivos que se pueden usar para unir moléculas al soporte incluyen polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y similares. Los expertos en la técnica conocen bien

dichas moléculas y procedimientos de acoplamiento de estas moléculas a antígenos. Véase, por ejemplo, Brinkley, M.A. (1992) Bioconjugate Chem. 3:2-13; Hashida y col. (1984) J. Appl. Biochem. 6:56-63; y Anjaneyulu y Staros (1987) International J. of Peptide and Protein Res. 30:117-124.

Después de la reacción del soporte sólido con los componentes de fase sólida, mediante lavado se eliminan del soporte todos los componentes de fase sólida no inmovilizados y, después, los componentes unidos al soporte se ponen en contacto con una muestra biológica de la que se sospecha que contiene anticuerpos contra el VHC (denominados en conjunto en el presente documento “moléculas ligando”) en condiciones de unión adecuadas. Si en la muestra hay anticuerpos frente al VIHC, formarán un complejo con los antígenos del VHC sobre el soporte sólido. Después de lavar para eliminar todas las moléculas ligando no unidas se añaden los anticuerpos marcados de forma detectable, tales como anticuerpos anti-xenogénicos (p. ej., anti-humanos) que reconocen un epítopo sobre anticuerpos anti-VHC. Estos anticuerpos se unen debido a la formación del complejo.

En la Figura 3 se muestra otro formato de ensayo. Este formato de ensayo, bien conocido en la técnica, usa un soporte sólido recubierto con estreptavidina que ha reaccionado con anticuerpos marcados con biotina que se unen al MEFA modificado y, opcionalmente, a NS3/4a, tal como un epítopo conformacional NS3/4a. La muestra se añade en condiciones de unión adecuadas. Si en la muestra hay anticuerpos frente al VHC, formarán un complejo con los antígenos del VHC. Después de lavar para eliminar todas las moléculas ligando no unidas se añaden los anticuerpos marcados de forma detectable, como se ha descrito anteriormente.

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

En un formato convencional, la cantidad de anticuerpos frente al VHC que forman el complejo antígeno-anticuerpo está controlada directamente. Esto se puede conseguir determinando su los anticuerpos anti-xenogénicos (p. ej., anti-humanos) que reconocen un epítopo sobre anticuerpos anti-VHC se unirán debido a la formación del complejo. En un formato competitivo, la cantidad de anticuerpos contra el VHC en la muestra se deduce monitorizando el efecto de la competición sobre la unión de una cantidad conocida de anticuerpo marcado (u otro ligando competitivo) en el complejo.

Más particularmente, los complejos formados que comprenden anticuerpo anti-VHC (o, en el caso de los ensayos competitivos, la cantidad de anticuerpo competitivo) se detectan mediante cualquiera de una serie de técnicas conocidas, dependiendo del formato. Por ejemplo, los anticuerpos frente al VHC no marcados en el complejo se pueden detectar usando un conjugado de Ig anti-xenogeneica en complejo con un marcador (p. ej., un marcador enzimático). En un formato de ensayo de inmunoprecipitación o aglutinación, la reacción entre los antígenos del VCH t el anticuerpo forma una red que precipita en la solución o suspensión y forma una capa o película visible de precipitado. Si no hay anticuerpo anti-VHC presente en la muestra de prueba, no se forma ningún precipitado visible.

En una realización alternativa, el MEFA modificado o NS3/4a se puede usar en un formato de ensayo de tipo sándwich como agente de detección. Los ensayos de tipo sándwich son bien conocidos en la técnica.

Los reactivos de ensayo descritos con anterioridad, incluido el soporte sólido de inmunoensayo con anticuerpos y antígenos unidos, así como los anticuerpos y antígenos que se van a hacer reaccionar con la muestra capturada, se pueden proporcionar en kit, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, con el fin de realizar los inmunoensayos tal como se ha descrito anteriormente. Normalmente el kit contendrá en contenedores separados la combinación de antígenos (ya unidos a una matriz sólida o por separado con reactivos para su unión a la matriz), formulaciones de anticuerpo control (positivos y/o negativos), anticuerpos marcados cuando el formato de ensayo lo requiere y reactivos generadores de señal (p. ej., sustrato enzimático) si el marcador no genera una señal directamente. Normalmente en el kit vienen incluidas las instrucciones (p. ej., por escrito, cinta, VCR, CD-ROM etc.) para llevar a cabo el ensayo. El kit también puede contener, según el inmunoensayo concreto usado, otros reactivos y materiales envasados (es decir, tampones de lavado y similares). Varios inmunoensayos, como los que se han descrito en lo que antecede, se pueden realizar usando estos kits.

III. Parte experimental

A continuación se encuentran ejemplos de formas de realización específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se permiten algunos errores y desviaciones experimentales.

Ejemplo 1

Construcción de MEFA 7.1 y MEFA 7.2

El ejemplo siguiente ilustra la preparación de un casete de poliproteína de múltiples epítopos del VHC. La poliproteína expresada a partir del casete de múltiples epítopos se denomina, en el presente documento, antígeno de fusión de múltiples epítopos (MEFA). Preferentemente, cuando se repite un epítopo, la copia o copias adicionales se disponen en tándem en la misma orientación. Se entiende que la región de una secuencia codificadora viral usada como epítopo se puede variar ligeramente y seguir conservando actividad antigénica y que la designación de la numeración de aminoácidos puede variar de una cepa a otra. Por tanto, los epítopos repetidos pueden variar con respecto a otro en una secuencia de aminoácidos debido a las variaciones de secuencia de la cepa y/o la designación de la numeración. Preferentemente, las secuencias de aminoácidos de epítopos repetidos dentro de un MEFA tienen una homología de al menos el 30 % a nivel de aminoácido, más preferentemente una homología de al menos el 40 % a nivel de aminoácido.

Se introdujeron sitios únicos para enzimas de restricción con el fin de conectar los epítopos en el orden prescrito y potenciar la utilidad de la invención facilitando las modificaciones del diseño de un antígeno quimérico. Un experto en la técnica de la tecnología de ADN recombinante determina fácilmente la elección de los sitios para enzimas de restricción y los procedimientos de clonación. Preferentemente, las uniones del epítopo (secuencias de aminoácidos creadas entre epítopos debido a la clonación) no generan epítopos inespecíficos. Los epítopos inespecíficos son, por ejemplo, secuencias que no son del VHC que no existen adyacentes a los epítopos del VHC en la naturaleza. Los epítopos inespecíficos se pueden unir a anticuerpos en una muestra de prueba produciendo resultados de ensayos falsos positivos. Preferentemente, la proteína de fusión de múltiples epítopos se analiza para detectar resultados falsos positivos debido a las secuencias generadas en las uniones del epítopo. Para evitar interacciones inespecíficas con la MEFA debido a las secuencias de unión, la secuencia de ADN que codifica la unión puede, por ejemplo, mutarse de modo que se reducen las interacciones inespecíficas con la secuencia de aminoácidos mutantes y es posible la clonación de los fragmentos de epítopo.

Los casetes de expresión de MEFA 7.1 y 7.2 del VHC se construyeron clonando las secuencias nucleotídicas de codificación que contienen epítopos principales en una matriz en tándem, como se muestra en, por ejemplo, las Figuras 4 y 8 que muestran representaciones en diagrama de MEFA 7.1 y 7.2, respectivamente. Un epítopo principal se escogió en base a la frecuencia de la reacción del anticuerpo y la intensidad de la reacción (título) con el epítopo (Chein, D.Y. y col. (1994) Viral Hepatitis and Liver Disease, pág. 320-324). Los diversos fragmentos de ADN que codifican los epítopos del VHC se construyeron mediante amplificación por PCR o mediante oligonucleótidos sintéticos. Los aminoácidos de cada segmento de MEFA 7.2 se indican en la Tabla 2 anteriormente y se muestran en las Figuras 9A-9F. Choo y col., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455determinaron la secuencia completa de aminoácidos del VHC-1 (3011 aminoácidos). En la patente de EE.UU. nº 5.350.671 se describen oligonucleótidos capaces de unirse a VHC. La numeración de los aminoácidos en los epítopos de la invención sigue la designación de numeración proporcionada en Choo y col., anteriormente, en la que el aminoácido número 1 es la primera metionina codificada por la secuencia de codificación de la región del núcleo, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, un segmento de epítopo de NS5 está representado por los aminoácidos 2278 a 2313 de la poliproteína del VHC. Un epítopo de la región E1 está representado por los aminoácidos 303 a 320, numerados con respecto a la poliproteína del VHC.

Los MEFA 7.1 y 7.2 contienen, cada uno, epítopos de VHC-1, VHC-2 y VHC-3, lo que permite la detección de múltiples tipos de un virus en un único ensayo. En el documento WO 96/27153 se encuentran procedimientos para determinar el serotipo del VHC. Por ejemplo, se ha encontrado que los epítopos de la región 5-1-1 varían entre los serotipos del VHC. Una copia de cada uno de los epítopos de la región 5-1-1 específicos del tipo de VHC en los MEFA descritos en el presente documento permite la unión de cualquiera de los tipos de VHC que pueden estar presentes en la muestra biológica de prueba.

Las construcciones MEFA se sometieron a ingeniería genética para expresión en *Saccharomyces cerevisiae,* usando el vector de expresión en levaduras pBS24.1, que contiene secuencias de 2 μ para la replicación autónoma en levaduras y los genes de levadura *leu2-d* y *URA3* como marcadores seleccionables. El gen de la β-lactamasa y el origen de replicación de ColE1, requerido para la replicación del plásmido en bacterias, también estaban presentes en este vector de expresión. El vector de expresión en levaduras para MEFA 7, ps.MEFA7, se construyó en primer lugar. Posteriormente, el plásmido se modificó en la región codificadora para los epítopos del núcleo del VHC para crear el plásmido ps.MEFA7.1, que codifica el antígeno MEFA7.1. Por último, el antígeno MEFA 7.2 se creó mutando los sitios de escisión proteolítica de NS3 presentes en las posiciones de aminoácidos 1428/1429, 1455/1456, 1657/1658 y 1711/1712 (en el epítopo 5-1-1, presente como tres repeticiones).

En particular, como se muestra en las Figuras 6A-6D se construyó un plásmido de expresión en levaduras para MEFA 7 del siguiente modo. En primer lugar, a partir del plásmido de expresión ps.MEFA6 que codifica MEFA 6 (Figura 12C), descrito en la publicación internacional nº WO 97/44469, se aisló un fragmento de *BamH*I/*Hind*III de 186 pb que codifica el promotor híbrido ADH2/GAPDH, hSOD (SOD humana, aminoácidos 1-156), seguido de un epítopo de E1 (aminoácidos 303-320, cepa VHC-1). A continuación se creó un fragmento de ADN sintético de *Hind*III/*Sph*I de 269 pb, que contiene la secuencia codificadora para el epítopo consenso E2 HVR1a (aminoácidos 390-410, VHC-1), el epítopo consenso E2 HVR1+2 (aminoácidos 384-414, HCV1+2) y el extremo 5' del dominio helicasa (aminoácidos 1193-1229, VHC-1). A partir del ADN del plásmido pTac5/HelI se purificó en gel un fragmento *SphI/EclX*I de 1264 pb, que codifica el resto del dominio

helicasa (aminoácidos 1230-1651, VHC-1). El fragmento de ADN sintético de *Hind*III/*Sph*I y el fragmento de 1264 pb de *Sph*I/*EclX*I se unieron en el vector pSP72new.*Hind*III/*EclX*I para producir pSP72new.HindIII/EclXI/e2.helicasa. Este vector derivó de pSP72, un vector de *E. coli* disponible comercialmente en Promega, Madison, WI (véase, GenBank/EMB, número de registro X65332). En particular, para facilitar la subclonación de varios epítopos de MEFA 7 se introdujo un nuevo poliengarce del sitio de clonación múltiple (MCS) mediante oligos sintéticos, entre los sitios *Sph*I y *Bgl*II de pSP72. Este nuevo plásmido, denominado pSP72new, se digirió con *Hind*III y *EclX*I (también conocido como *Eag*I), que tienen sitios únicos en el MCS. Después se desfosforiló y purificó en gel.

Las células HB101 competentes se transformaron con el plásmido y se sembraron en placas Luria con agar que contienen 100 μg/ml de ampicilina. Los clones deseados se identificaron usando análisis de ADN miniprep. Después de la verificación de la secuencia, el subclon nº 4 del plásmido pSP72new.*Hind*III/*EclX*I/e2.helicasa se digirió con *Hind*III and *EclX*I(EagI) para generar un fragmento de 1534 pb. El fragmento de *Hind*III/*EclX*I se purificó en gel y se ligó con los oligonucleótidos *EclX*I/*Sph*I, que codifican los últimos aminoácidos del dominio helicasa (aminoácidos 1651-1658, VHC-1) en un vector pGEM7 sometido a *Hind*III/*Sph*I. Las células HB101 competentes se transformaron y se sembraron en Luria-ampicilina. Tras la identificación de los clones deseados y la confirmación de la secuencia, el subclon nº 9 de , pGEM7*Hind*III/*Sph*I se digirió con *Hind*III y *Sph*I para generar un fragmento de 1560 pb, que se purificó en gel (Véase, la Figura 6A).

Para ensamblar la porción del extremo 3' de MEFA 7, se realizaron las etapas siguientes. Los epítopos 5-1-1 (aminoácidos 1689-1735) de VHC1-, VHC-3 y VHC-2 (en este orden) se aislaron en gel a partir de ps.MEFA6, el plásmido de expresión que codifica MEFA 6, descrito en la publicación internacional nº WO 97/44469, como un fragmento de *Sph*I/*Ava*I de 441 pb. Este fragmento se ligó con oligonucleótidos sintéticos *Ava*I/*Xba*I que codifican el epítopo c100 (aminoácidos 1901-1936) en un vector pSP72new.*Sph*I/*Xba*I. Después de la transformación de HB101, la identificación del clon y la verificación de la secuencia, el subclon nº 6 pSP72newSXi se digirió con *Xba*I and *Not*I para preparar un vector pSP72new*Xba*I/*Not*I. Adicionalmente, a partir de ps.MEFA6 se aisló un fragmento de *Xba*I/*Noc*I de 221 pb que codificaba una doble repetición de un epítopo de NS5 (aminoácidos 2278-2313, VHC-1). El fragmento de *Xba*I/*Noc*I se ligó con los oligonucleótidos *NocI/Not*I, que codifican los primeros aminoácidos del epítopo del núcleo del VHC, los aminoácidos 9-17, en los que la Lys en la posición 9 se cambió a Arg y la Asn en la posición 11 se cambió a Thr en el vector pSP72new*Xba*I/*Not*I preparado anteriormente. Los transformantes HB101 se analizaron y se secuenció su ADN plasmídico. Un subclon, denominado pSP72newSX/XNi nº 3, se digirió con *Not*I/*Sal*I para preparar un vector para la posterior subclonación (véase la Figura 6B).

Para completar el ensamblaje del extremo 3' de MEFA 7, una doble repetición de la secuencia que codifica un epítopo del núcleo con los aminoácidos 9-53 del VHC-1 más dos epítopos específicos del genotipo de la región del núcleo (aminoácidos 64-88, VHC-1 y aminoácidos 67-84, VHC-2) se subclonaron del siguiente modo en el subclon nº 3 pSP72newSX/XNi digerido con *Not*I/*Sal*I. En primer lugar, a partir del clon nº 20 pd.Core191RT se aisló un fragmento de *Not*I/*Xmn*I de 92 pb que codifica los aminoácidos 18-51 del epítopo del núcleo El plásmido pd.Core191RT se construyó ligandos en el vector de expresión en levaduras pBS24.1*BamH*I-*Sal*I un fragmento de 1365 pb de 1*BamH*I-*Nco*I para el promotor ADH2/GAPDH y un fragmento de 615 pb de *Nco*I-*Sal*I que codifica los primeros 191 aminoácidos del núcleo del VHC-1 con el aminoácido 9 mutado de Lys a Arg y el aminoácido 11 mutado de Asn a Thr. El fragmento de 615 pb de *Nco*I-*Sal*I derivó de un vector de expresión de E. coli en el que se había clonado la secuencia del núcleo para los aminoácidos 1-191 con las mismas dos mutaciones descritas anteriormente.

El fragmento de *Not*I/*Xmn*I de 92 pb se ligó con un vector pSP72newNot/Kpn y con los oligonucleótidos *Xmn*I/*Kpn*I, que codifican el extreme 3' del epítopo del núcleo completo. Después de la verificación de la secuencia de los clones positivos, el subclon nº 4 pSP72newNKi se digirió con *Not*I y *Kpn*I y se aisló un fragmento de 224 pb. Este fragmento de *Not*I y *Kpn*I se ligó con 284 pb de oligonucleótidos (extremos *Kpn*I-*Sal*I) que codifican una repetición completa del epítopo del núcleo descrito anteriormente en el vector pSP72newSX/XNi NotI/SalI descrito anteriormente. Tras la transformación de HB101, la identificación del clon y la confirmación de la secuencia, el subclon nº 18 de pSP72newSX/XN/NSi se digirió con *Sph*I y *SalI* y se aisló en gel un fragmento de 1317 pb (Véase, la Figura 6C).

Por último, los fragmentos siguientes, descritos anteriormente, se ligaron en el vector de expresión de levaduras pBS24.1 *BamH*I/*Sal*I para crear ps.MEFA7 (véase la Figura 6D):

el fragmento de *BamH*I/*HindII*I de 1896 pb (Figura 6A)

el fragmento de *HindII*I/*Sph*I de 1560 pb (Figura 6A)

el fragmento de *Sph*I/*Sal*I de 1317 pb (Figura 6C)

La cepa AD3 de *S. cerevisiae* se transformó con ps.MEFA7 y los transformantes sencillos se comprobaron para detectar la expresión tras la depleción de glucosa en el medio. La proteína recombinante se expresó a niveles altos en levaduras, detectado mediante tinción con azul de Coomassie. En particular, las células de levadura se transformaron con el plásmido de expresión de MEFA usando un protocolo con acetato de litio. Los transformantes Ura$^-$ se sembraron en

colonias aisladas y se pasaron en parches a placas Leu⁻/glucosa al 8 % para incrementar el número de copias del plásmido. Los cultivos de inicio Leu⁻ se cultivaron durante 24 horas a 30 ºC y, después, se diluyeron al 1:20 en medio YEPD (extracto de levadura con bactopeptona y 2 % de glucosa). Las células se cultivaron durante 48 horas a 30 ºC y se recogieron. Para comprobar la expresión del antígeno recombinante MEFA 7, un alícuota de las células se lisó con perlas de vidrio en tampón de lisis (Tris-Cl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 10 mM). El lisado se centrifugó a velocidad alta. El sobrenadante y el sedimento insoluble se analizaron en geles con SDS proteína. MEFA7 era muy rico en la fracción insoluble del sedimento.

El antígeno MEFA7 se purificó del siguiente modo. Se recogieron las células de *S. cerevisiae* que expresaban MEFA7 tal como se ha descrito anteriormente. Las células se suspendieron en tampón de lisis (Tris 50 mM, NaCl, 0,5 M, EDTA 1 mM, PMSF mM, pH 8,0) y se lisaron en un Dyno-Mill (Wab Willy A. Bachofon, Basilea, Suiza) o un aparato equivalente usando perlas de vidrio. El lisado se centrifugó en condiciones de velocidad baja (de 3.000 a 5.000 rpm, 15 minutos) y el sedimento que contenía la fracción de proteína insoluble se lavó con concentraciones crecientes de urea (1 M, 2 M, 3 M) en tampón de lisis. La proteína se solubilizó a partir del sedimento de centrifugación con NaCl 0,1N, urea 4M en tampón de lisis. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación a velocidad baja a 3.000 a 5.000 rpm, 15 minutos. El sobrenadante se ajustó a un pH 8,0 con HCl 6N para precipitar las proteínas insolubles en estas condiciones.

El precipitado se eliminó mediante centrifugación y el sobrenadante se ajustó a 2,3 % de SDS, DTT 50 Mm, pH 8,0 y se llevó a ebullición durante 3 minutos. las proteínas de la mezcla se fraccionaron mediante filtración en gel en Pharmacia Sephacryl S-400 en solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,1 % de SDS, EDTA 1 mM y ajustada a un pH 7,4. Las fracciones que eluyeron de la columna que contenían MEFA7 se recogieron, combinaron y concentraron en una membrana Amicon YM-30. La filtración en gel se repitió en las fracciones combinadas usando la misma columna y condiciones.

Durante el análisis del MEFA 7 en un ensayo se descubrió que un anticuerpo monoclonal usado como un conjugado de detección reaccionó con una secuencia específica del epítopo del núcleo (aminoácidos 33-38). Por tanto se diseñó un ps.MEFA7.1 para eliminar los aminoácidos 33-38 de la región del epítopo del núcleo.

Un vector de expresión en levaduras para MEFA 7.1 se construyó del siguiente modo. En primer ligar se modificó la doble repetición del epítopo del núcleo en el extremo 3' de ps.MEFA7. Para ello, un fragmento sintético de *Nco*I/*Kpn*I de 206 pb, que codifica la primera repetición del epítopo del núcleo (aminoácidos 9-32, 39-42 y 64-88 del VHC-1 y los aminoácidos 67-82 del VHC-2) y un fragmento sintético de *Kpn*I/*Sal*I de 233 pb que codifica los aminoácidos 83 y 84 del VHC-2, seguido de la segunda repetición del epítopo del núcleo (los aminoácidos 9-32, los aminoácidos 39-42 y los aminoácidos 64-88 del VHC-1, los aminoácidos 67-84 del VHC-2) se subclonaron respectivamente en un vector pSP72new.NcoI/KpnI y un vector pSP72new.KpnI/SalI. Después de la transformación de HB101, la identificación del clon y la verificación de la secuencia, el subclon nº 21 pSP72newNKi se digirió con *Nco*I y *Kpn*I para aislar el fragmento *Nco*I/*Kpn*I de 206 pb y el clon nº pSP72newKSi se digirió con *Kpn*I y *Sal*I para aislar el fragmento *Kpn*I/*Sal*I de 233 pb.

El plásmido ps.MEFA7.1 se ensambló ligando los fragmentos siguientes en el vector de expresión en levaduras pBS24.1 *BamH*I/*Sal*I (véase la Figura 7):

el fragmento de *BamH*I/*HindII*I de 1896 pb descrito anteriormente para ps.MEFA7;

el fragmento de *HindII*I/*Sph*I de 1560 pb descrito anteriormente para ps.MEFA7;

un fragmento de *Sph*I/*Nco*I de 776 pb aislado de ps.MEFA7 que codifica los epítopos 5-1-1, epítopo c100 y epítopo NS5;

el fragmento de *Nco*I/*Kpn*I de 206 pb;

y el fragmento de *Kpn*I/*Sal*I de 233 pb.

La cepa AD3 de *S. cerevisiae* se transformó con ps.MEFA7.1 y los transformantes sencillos se comprobaron para detector la expresión tras la depleción de glucosa en el medio, como se ha descrito anteriormente. La proteína recombinante se expresó a niveles altos en levaduras, detectado mediante tinción con azul de Coomassie.

El antígeno MEFA7.1 se purificó del siguiente modo. Se recogieron las células de *S. cerevisiae* que expresaban MEFA7.1 tal como se ha descrito anteriormente. Las células se suspendieron en tampón de lisis (Tris 50 mM, NCl, 0,5 M, EDTA 1 mM, PMSF mM, pH 8,0) y se lisaron en un Dyno-Mill (Wab Willy A. Bachofen, Basilea, Suiza) o un aparato equivalente usando perlas de vidrio. El lisado se centrifugó a 10.000, 30 minutos en un rotor JA-10) y el sedimento que contenía la fracción de proteína insoluble se lavó con concentraciones crecientes de urea (1 M, 2 M, 3 M) en tampón de lisis. La proteína se solubilizó a partir del sedimento de centrifugación con NaCl 0,1N, urea 4M, DTT 50 mM en tampón de lisis. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 14.000, 20 minutos en un rotor JA-14. El sobrenadante se ajustó a pH 8,0 con HCl 6N para precipitar las proteínas insolubles en estas condiciones.

El precipitado se eliminó mediante centrifugación a 14.000, 20 minutos en un rotor JA-14. El sobrenadante se ajustó a 2,3

% de SDS y se calentó hasta 70-75 ºC en agua en ebullición, después se enfrió hasta la temperatura ambiente. Las proteínas de la mezcla se fraccionaron mediante filtración en gel en una Pharmacia Sephacryl S-400 HR en PBS que contiene 0,1 % de SDS, EDTA 1 mM y ajustada a un pH 7,4. Las fracciones que eluyeron de la columna que contenían MEFA 7.1 se recogieron, combinaron y concentraron en una membrana Amicon YM-30. Las fracciones de filtración en gel combinadas se ajustaron a 2,3 % de SDS, DTT 50 mM y se calentaron/enfriaron como anteriormente. Esta combinación se sometió a una segunda etapa de filtración en gel en una columna Pharmacia Sephacryl S-300 HR en las mismas condiciones que la primera etapa de filtración en gel.

Un vector de expresión en levaduras para MEFA 7.2 se construyó del siguiente modo. Para facilidad de la clonación, de este antígeno de fusión de múltiples epítopos de tamaño grande, la molécula se dividió en tres fragmentos de restricción. En primer lugar, un fragmento de *BamH*I-*HindII*I de 1896 pb se purificó en gel de ps-mefa7.1 (descrito anteriormente). Este fragmento codificaba el promotor ADH2/GAPDH, SOD humana y el epítopo E1 del VHC-1.

El fragmento siguiente, un fragmento de *HindII*I-*Sph*I de 1560 pb, que codifica la secuencia consenso E2 HVR-1a, la secuencia consenso E2 HCV1+2 y el dominio helicasa (VHC-1, los aminoácidos 1193-1658, con mutaciones en los aminoácidos 1428, 1429, 1455, 1456, 1657 y 1658, para eliminar los sitos de escisión de la proteasa) se subclonó en un vector pGEM7. En particular, la secuencia de codificación se mutó de forma tal que cada uno de los aminoácidos naturales en las posiciones 1428, 1455 y 1657 se sustituyó con una leucina, y cada uno de los aminoácidos naturales en las posiciones 1429, 1456 y 1658 se sustituyó con una prolina. Por tanto, la mutación en cada uno de los pares anteriores se denomina en el presente documento “LP”. Este subclon derivó del siguiente modo del subclon nº 9 pGEM7HindIII/SphI (denominado "pGEM7/HSi #9" y descrito anteriormente): (1) el subclon nº 9 pGEM7HindIII/SphI, que contiene un inserto de *HindII*I-*Sph*I de 1560 pb, se digirió con *Sac*II+*Sph*I, se desfosforiló y se purificó en gel, eliminando de este modo las 721 pb de la helicasa donde se localizaban los tres sitios de escisión de proteasa. (2) Se usaron oligos sintéticos para clonar la porción de *Sac*I-*Bgl*I de 266 pb de la helicasa que contiene las primeras dos mutaciones LP- Para facilitar la clonación, los oligos contenían sitios para *EcoR*1 y *Sal*I en los extremos 5-cebado y 3-cebado, respectivamente. Los oligos se clonaron en un vector pUC 19 EcoRI-SalI. Después de la transformación de HB101 y la verificación de los clones positivos, el pUC19 mefaSB #5 se amplificó y el fragmento de *Sac*I-*Bgl*I de 266 pb se purificó en gel. (3) un fragmento de *Bgl*I/*Eag*I de 429 pb se purificó en gel a partir del subclon nº 9 pGEM7HindIII/SphI. En esta región de la helicasa no hay mutaciones. (4) Para completar la porción de *Eag*I-*Sph*I de 26 pb de helicasa, que contiene la tercera mutación se usaron dos oligos adicionales. (5) El fragmento de *Sac*I-*Bgl*I de 266 pb, el fragmento de *Bgl*I-*Eag*I de 429 pb y estos dos oligos se ligaron en el vector del subclon nº 9 pGEM7*HindII*I/*Sph*I. A partir de uno de los clones HB101 resultantes, denominado pGEM7/SacII-EagI-SphI #6 (Figura 11A), se purificó en gel el fragmento de *HindII*I-*Sph*I de 1560 pb para MEFA 7.2.

El tercer fragmento de restricción necesario para MEFA 7.2, un fragmento de *Sph*I-*Sal*I de 1215 pb que codifica los dominios 5-1-1 para VHC 1, 2, 3, cada uno con una mutación PI en un sitio de escisión de proteasa, el epítopo C100, el epítopo NS5 por duplicado y los epítopos del núcleo por duplicado, se subclonó del siguiente modo: (1) el epítopo PI 5-1-1 para VHC-1 se clonó con oligos sintéticos en un vector pUC19 *EcoR*1-*Sal*I. Los oligos contenían los sitios *Sph*I y *Nru*I adyacentes a los sitios de clonación de *EcoR*1 y *Sal*I, respectivamente. Después de la transformación de HB101 y la verificación de los clones positivos, el pUC19 mefaSN #16 se amplificó y el inserto de *Sph*I-*Nru*I de 147 pb se purificó en gel. (2) un fragmento de *Nru*I-*Nco*I de 629 pb que codificaba 5-1-1PI para VHC-3 y VHC-2, C100 y las repeticiones de NS5 se purificó en gel a partir de ps.mefa13 #12 (descrito en la patente de EE.UU. nº 6.660.298). (3) un fragmento de *Nco*I-*Sal*I de 439 pb que codificaba las dos repeticiones de los epítopos del núcleo se purificó en gel a partir de ps.mefa7.1 #15. (4). El fragmento de *Sph*I-*Nru*I de 147 pb, el fragmento *Nru*I-*Nco*I de 629 pb y el fragmento de *Nco*I-*Sal*I de 439 pb se ligaron en un vector pGEM5 *Sph*I-*Sal*I. A partir de uno de los clones resultantes, pGEM5 SphI-SalI.mefa7.2 #62 (Figura 11B), se aisló en gel el inserto de *Sph*I-*Sal*I de 1215 pb.

Por último, el fragmento de *BamH*I-*HindII*I de 1869 pb, el fragmento *HindII*I-*Sph*I de 1560 pb y el fragmento de *Sph*I-*Sal*I de 1215 pb se ligaron en un vector de expresión en levaduras *BamH*I-*Sal*I pBS24.1 . Después de la transformación de HB101 y los análisis de minidetección selectiva se encontró que dos clones positivos tenían el tamaño correcto del inserto *BamH*I-*Sal*I. El ADN del plásmido se amplificó para ps.mefa7.2 #3 y #42 (Figura 11C).

La cepa AD3 de *S. cerevisiae* se transformó con ps.mefa7.2 usando el kit de transformación de Invitrogen Easy Comp Sc (Invitrogen, San Diego CA). Los transformantes Ura$^-$ se sembraron en colonias aisladas y se pasaron en parches a placas Leu$^-$/glucosa al 8 % para incrementar el número de copias del plásmido. Los cultivos de inicio Leu$^-$ se cultivaron durante 24 horas a 30 ºC y, después, se diluyeron al 1:20 en medio YEPD (extracto de levadura con bactopeptona y 2 % de glucosa). Las células se cultivaron durante 48 horas a 30 ºC y se recogieron. Para comprobar la expresión de la proteína recombinante, los alícuotas de las células se lisaron con perlas de vidrio en tampón de lisis (Tris-Cl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 10 mM). Los lisados se eliminaron mediante centrifugación a velocidad alta. Las fracciones insolubles del sedimento se analizaron mediante tinción con azul de Coomassie en geles con SDS proteína. La proteína MEFA 7.2 de 120 kDa se expresó a niveles elevados.

La presencia de MEFA se confirmó usando SDS-PAGE (4-20% de gel de Tris-glicina) y transferencia de tipo western, usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra h-SOD, ya que cada uno de los MEFA anteriores incluía los aminoácidos

1-156 de SOD humana.

La secuencia de ADN y la correspondiente secuencia de aminoácidos de MEFA 7.2 se muestran en las Figuras 9A-9F.

Ejemplo 2

Producción de NS3/4aPI

NS3/4aPI es una proteína NS3NS4a de longitud completa (aminoácidos 1027-1711) con mutaciones de los aminoácidos que se producen normalmente en las posiciones 1428 y 1429, para eliminar el supuesto sitio de autohidrólisis de la proteasa. Véase la patente de EE.UU. nº 6.630.298 y 6.632.601. Este epítopo tiene la secuencia especificada en las Figuras 13A a 13D y difiere de la secuencia nativa en las posiciones 403 (aminoácido 1428 de la secuencia completa del VHC-1) y 404 (aminoácido 1429 de la secuencia completa del VHC-1). Específicamente, la Thr que normalmente se encuentra en la posición 1428 de la secuencia nativa se ha mutado a Pro y la Ser que se produce en la posición 1429 de la secuencia nativa ha mutado a Ile. La molécula se denominó "NS3/4aPI." La molécula también se denomina en el presente documento "NS3NS4a PI'.

NS3/4aPI se produjo y expresó en levaduras como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.632.601. La presencia de la proteína NS3/4aPI se confirmó mediante transferencia de tipo western usando un anticuerpo policlonal dirigido contra el dominio de la NS3 proteasa y un anticuerpo monoclonal contra el epítopo 5-1-1 de NS4. La actividad proteasa del epítopo NS3/4a se demostró usando MEFA 7.1 como sustrato, como se describe adicionalmente más adelante.

Ejemplo 3

Actividad de escisión proteolítica de NS3/4aPI sobre MEFA 7.1 y 7.2

Con el fin de confirmar que el MEFA, MEFA 7.2, modificados no sufría escisión proteolítica, se realizó el experimento siguiente. Los MEFA 7.1 y 7.2 se incubaron cada uno con NS3/4aPI, producido como se ha descrito anteriormente, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las muestras de gel de proteína se prepararon y pasaron a través de SDS-PAGE con Tris-glicina 4-20 % y los geles se tiñeron usando azul de coomassie. Adicionalmente se realizaron transferencias de tipo western usando un anticuerpo contra hSOD. Como se ha descrito anteriormente, los MEFA 7.1 y 7.2 son ambos fusiones con hSOD. Los resultados se muestran en la FIG. 14A (SDS-PAGE) y 14B (transferencia de tipo western). Como se puede ver, el NS3/4a escindió el MEFA 7.1 (calle 5, Figuras 14A y 14B). Por otro lado, MEFA 7.2 no mostró degradación (calle 6, Figuras 14A y 14B). Por tanto, los sitios de escisión proteolítica de NS3 estaban mutados satisfactoriamente en MEFA 7.2.

Ejemplo 4

Ensayos de unión a anticuerpos monoclonales y policlonales

Los anticuerpos monoclonales y policlonales producidos contra los antígenos recombinantes del núcleo, E1, E2, NS3, NS4 y NS5 específicos del VHC se usaron para evaluar la antigeneicidad y la exposición al epítopo de MEFA 7.1, MEFA 7.2 y NS3/4a PI. Los MEFA o NS3/4a PI purificados se diluyeron a concentraciones de recubrimiento óptimas en PBS (pH 7,4) y se introdujeron en placas de unión alta Costar (Coming Inc., Corning, New York). Los anticuerpos, bien contra epítopos lineales bien contra epítopos conformacionales, se diluyeron adecuadamente y se añadieron a la placa. Tras incubación a 37 ºC durante 1 hora, la placa se lavó e incubó con IgG de cabra anti-ratón o de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a 37 ºC. Por último, a los pocillos se añadió un tampón de desarrollo que contenía H_2O_2 y el sustrato o-fenilendiamina diclorhidrato (OPD) y se determinó la densidad óptica (DO) a 492 y 620 nm con un lector de placas.

Como se muestra en la Tabla 3, cada uno de los anticuerpos específicos de epítopo analizados reaccionó con MEFA 7.1 and MEFA 7.2, lo que indicó (i) que todos los epítopos principales sobre los MEFA estaban expuestos y, por tanto, accesibles para detector e (ii) las mutaciones de aminoácidos en MEFA 7.2 no distorsionaban la exposición de los epítopos lineales.

Ejemplo 5

Inmunoensayos usando MEFA y NS3/4aPI

El antígeno C33c de NS3 y el antígeno del núcleo C22 son muy inmunogénicos y los anticuerpos frente a C33c y C22 se encuentran en los paneles de seroconversión temprana (Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015.) Por tanto, el rendimiento de los antígenos en los inmunoensayos se estudió usando los panetes de C33c y C22 disponibles comercialmente de muestras de sangre humana infectada por el VHC para evaluar la sensibilidad de la seroconversión. Los panetes de PHV mostrados en las tablas que figuran más adelante se adquirieron en Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA (BBI); Bioclinical Partners, Franklin, MA (BCP); y North American Biologics, Inc.,

BocoRatan, FL (NABI). Los ensayos se realizaron del siguiente modo.

Los antígenos del VHC se introdujeron en las placas para inmunoensayo del siguiente modo. El tampón de revestimiento del VHC (Na_3PO_4 50 mM a pH 7,0, EDTA 0,2 mM y 0,1% de cloroacetamida) se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 μ. A continuación, secuencialmente se añadieron los reactivos siguientes al tampón de revestimiento del VHC y se agitó tras cada adición: 2 μg/ml de BSA-sulfhidrilo modificado, de una solución de 10 mg/ml (Bayer Corp. Pentex, Kankakee, Illinois); DTT 5 mM de una solución 1M (Sigma, St. Louis, MO); 0,45 μg/ml de NS3/4a (concentración de proteína de 0,3 mg/ml); 0,375 μg/ml de NS3.4aPI, MEFA 7.1 o MEFA 7.2 (concentración de proteína de 1 mg/ml). La solución final se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

A cada pocillo de una placa de fondo plano de unión alta Costar (Corning Inc., Corning, New York) se añadieron 200 μl de la solución anterior y las placas se incubaron durante 16 horas a temperatura ambiente. Después, las placas se lavaron con tampón de lavado (1 x PBS, 0.1% TWEEN-20), se dieron golpecitos para secar y se añadieron 285 μl de tampón posrevestimiento Orto (1 x PBS, pH 7,4, 1% BSA, 3% sacarosa). Las placas se incubaron durante al menos 1 hora, se dieron golpecitos y se secaron durante la noche a 2-8 ºC. Las placas se introdujeron en una bolsa con desecantes y se almacenaron a 4 ºC para usos futuros.

El ensayo del VHC se realizó del siguiente modo: 200 μl del tampón diluyente de muestras (1 g/l de caseína, 100 mg/l de SOD recombinante humana, 1 g/l de cloroacetamida, 10 g/l de BSA, 500 mg/l de extracto de levadura, 0,366 g/l de EDTA, 1,162 g/l de KPO_4, 5 ml/l de Tween 20, 29,22 g/l de NaCl, 1,627 g/l de $NaPO_4$, 1 % de SDS) se añadieron a las placas revestidas. Después, se añadieron 20 μl de la muestra. Esto se incubó a 37ºC durante una hora. Las placas se lavaron con tampón de lavado (1 x PBS, pH 7,4, 0,1% de Tween-20). Se añadieron 200 μl de la solución conjugada (una IgG anti-humana de ratón-HRP, tal como IgG anti-humana de ratón-HRP diluida a 1:22.000 en el sistema del ensayo ORTHO HCV 3.0 ELISA con diluyente conjugado en masa Enhanced SAVe (-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) y se incubaron durante 60 minutos a 37 ºC. Esto se lavó como se ha indicado anteriormente y se añadieron 200 μl de la solución sustrato (1 comprimido de OPD/10 ml). El comprimido de OPD contiene o-fenilendiamina diclorhidrato y peróxido de hidrógeno para el desarrollo del color con la reacción con peroxidasa de rábano. Esto se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μl de H_2SO_4 4N y las placas se leyeron a 492 nm respecto a la absorbancia a 690 nm como control. El valor de corte se fijó a 0,6000 + de señal media (DO) de los tres sueros control negativo. Las muestras con valores S/CO (DO de la proporción de la señal sobre el corte) iguales o superiores a 1,0 se consideraron positivas y aquéllas con valores inferiores a 1,0 se consideraron negativas.

Los resultados usando este inmunoensayo se compararon con los obtenidos usando los kit de ELISA anti-VHC comerciales. En concreto, el ensayo Abbott PRISM (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) está disponible comercialmente y es un ensayo de detección basado en anticuerpos. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema ORTHO HCV Versión 3.0 ELISA Test System (HCV 3.0) (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) es un ensayo de detección basado en anticuerpos. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo Pasteur MONOLISA anti-HCV Plus Versión 2 (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, Francia) es un ensayo de detección basado en anticuerpos. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Para los paneles analizados, MEFA 7.1 solo y MEFA 7.2 solo tenían inmunorreactividades muy similares y ambos detectaron anticuerpos de tipo C22 en el panel de seroconversión PHV 913 y anticuerpos de tipo C33c en extracciones posteriores de los paneles de PHV 904 y PHV 914 (Tabla 4). Por otro lado, NS3/4a PI detectó anticuerpos de tipo C33c en extracciones tempranas de los paneles de PHV 904 y PHV 914 (Tabla 4). Por tanto, la combinación de MEFA 7.1 o MEFA 7.2 y NS3/4a PI detectó anticuerpos frente a C22 y C33c en muestras de seroconversión temprana. Las detecciones fueron 2 y 12 días antes de los ensayos actualmente con licencia Ortho HCV 3.0 y Abbott Prism en los anticuerpos de tipo C33c y C22, respectivamente.

Se analizó un total de 17 paneles de seroconversión del VHC disponibles comercialmente. Para los panetes de tipo anti-C33s, los antígenos nuevos estaban de 2 a 14 días antes de Ortho 3.0 y Abbott Prism en 9 de 9 paneles. Para los panetes de tipo anti-C22 (del núcleo), los antígenos nuevos estaban de 2 a 5 días antes de Ortho 3 y Abbott Prism en 3 de 8 paneles y de Abbott Prism en 2 de 8 paneles. El resto de los paneles fueron equivalentes. Cabe destacar que entre los cinco paneles anti-núcleo que muestran un rendimiento equivalente entre el ensayo nuevo y el ensayo con licencia, tres paneles tenían intervalos de extracción grandes entre el cambio desde negativo para los anticuerpos a positivo para los anticuerpos: PHV 909 (28 días), PHV 911 (11 días) y SC-0010 (7 días). Véase la Tabla 6. Debido a la longitud de los intervalos de extracciones fue difícil comparar la sensibilidad de seroconversión entre el ensayo nuevo y los ensayos con licencia usando estos tres paneles.

La sensibilidad de la dilución del genotipo también se comparó usando los antígenos frente a estos ensayos disponibles comercialmente. Los tres inmunoensayos se realizaron de forma simultánea. Como se muestra en la Tabla 5, todos los genotipos del VCH diluidos en serie 1-6 se detectaron considerablemente con MEFA 7.1 y NS3/4a PI en el ensayo ELISA en comparación con HCV 3.0 o Monolisa Ver. 2 Pasteur. En un experimento aparte se comparó la sensibilidad de la dilución de los genotipos usando MEFA 7.1 o NS3/4a PI solos.

En resumen, el ensayo del anticuerpo del VHC empleando NS3/4a PI y MEFA 7.1 o MEFA 7.2 obtuvo mayor sensibilidad tanto en la detección de seroconversión temprana como en la detección de muestras de varios genotipos. La especificidad del ensayo coincidió con la de los ensayos con licencia actualmente. Ambos antígenos estaban muy purificados y se produjeron en cantidades adecuadas para el desarrollo del producto. Una vez que se usó NS3/4a PI y MEFA 7.1 o MEFA 7.2 para recubrir la fase sólida, estaban considerablemente estables. MEFA 7.1 tiene múltiples sitios de escisión por la proteasa NS3/4a PI y se degrade en varios fragmentos durante el revestimiento de los antígenos (Figuras 14A y 14B), aunque la inmunorreactividad de la proteína de fusión pareció no estar afectada en estos experimentos (Tablas 4 and 5). El MEFA 7.2 mejorado está intacto en presencia de NS3/4a PI (Figuras 14A y 14B) y la exposición al epítopo y la inmunorreactividad son muy similares a las de MEFA 7.1 (Tablas 3, 4 y 5). Estos datos ponen de manifiesto que la mayor sensibilidad de la detección en muestras de seroconversión temprana deriva de múltiples epítopos en los MEFA 7.1 y 7.2; la estructura global de la propia proteína de fusión MEFA, bien intacta como en MEFA 7.2 o bien degradada como en MEFA 7.1, tiene pocos efectos sobre la detección de seroconversión temprana. No obstante, el mantenimiento de la integridad del MEFA hace que la fabricación de los componentes del inmunoensayo sea más eficiente.

De acuerdo con esto se han divulgado nuevos MEFA modificados y usos de los mismos en los ensayos de detección.

TABLA 3. ANÁLISIS ELISA DE MEFA 7.1 Y MEFA 7.2 PARA EPÍTOPOS DEL VHC EXPUESTOS

ANTICUERPO	CLON	DO CON:	
		MEFA 7.1	MEFA 7.2
ANTICUERPO MONOCLONAL			
ANTI-NÚCLEO	5H8/H6	0,830	0,745
ANTI-NÚCLEO	6H4/H8	0,742	0,807
ANTI-5-1-1	6C10/D1	3,368	3,366
ANTI-C33C	4D1-1	3,142	3,237
ANTI-NS5	3E1/F1	3,510	3,477
SUERO NORMAL DE RATÓN		0,152	0,122
POLICLONAL DE CONEJO			
ANTI-E1		1,649	1,223
ANTI-E2 HVR1A CONSENSO		1,784	1,783
ANTI-E2 HVR1+2 CONSENSO		1,302	1,441
ANT-C22		1,528	1,483
ANTI-HELICASA		1,802	1,815
ANTI-C100		1,795	1,811
SUERO NORMAL DE CONEJO		0,100	0,102

TABLA 4. Comparación de la detección de seroconversión del VHC

Panel de seroconversión	Día de extracción	MEFA 7.1	MEFA 7.2	NS3NS4a PI	MEFA 7.1 NS3NS4a PI	MEFA 7.2 + NS3NS4a PI	Orto VHC 3.0	Abbott PRISM	Días por delante[b]
PHV904-1	0	0,04	0,03	0,04	0,05	0,05	001	0,12	
PHV904-2	2	0,02	0,03	0,03	0,04	0,04	0,01	0,028	
PHV904-3	7	0,33	0,23	**1,83**	**1,79**	**2,47**	0,33	0,51	

PHV904-4	9	**1,28**	**1,28**	**5,19**	**3,99**	**5,39**	**1,10**	**1,56**	2
PHV904-5	14	**2,17**	**2,75**	**5,76**	**5,14**	**5,70**	**3,27**	**3,54**	
PHV904-6	21	**2,43**	**3,29**	**5,81**	**5,24**	**5,78**	**3,92**	**4,45**	
PHV904-7	23	**2,73**	**3,57**	**6,31**	**6,36**	**6,31**	**4,26**	**4,69**	
PHV914-1	0	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,00	0,06	
PHV914-2	5	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,01	0,06	
PHV914-3	9	0,03	0,02	0,07	0,11	0,14	0,01	0,06	
PHV914-4	12	0,09	0,03	**1,25**	**1,38**	**2,09**	0,04	0,09	12
PHV914-5	16	0,44	0,28	**3,22**	**2,80**	**4,28**	0,33	0,47	
PHV914-6	19	0,73	0,65	**3,51**	**3,23**	**4,75**	0,82	0,90	
PHV914-7	24	**2,00**	**2,23**	**4,69**	**4,72**	**5,52**	**3,10**	**2,41**	
PHV914-8	30	**2,73**	**4,23**	**5,47**	**5,,15**	**5,62**	**4,85**	**4,09**	
PHV914-9	33	**2,95**	**4,64**	**5,65**	**5,36**	**5,66**	**4,85**	**4,52**	
PHV913-1	0	0,08	0,09	0,03	0,11	0,08	0,01	0,08	
PHV913-2	2	0,41	0,55	0,02	0,71	0,56	0,02	0,10	
PHV913-3	7	**1,62**	**2,47**	0,07	**2,66**	**2,90**	0,43	0,50	> 2
PHV913-4	9	**1,88**	**2,71**	0,43	**2,83**	**3,41**	0,54	0,59	

AQ:K [a] Un S/CO superior o igual a 1 es positivo y se indica en negrita. El valor de corte se calcula como se ha descrito en Materiales y Procedimientos.

[b]Número de días por los cuales la detección con NS3NS4a PI en combinación con MEFA 7.1 o MEFA 7.2 precede a la detección mediante los ensayos con licencia actualmente.

TABLA 5. Comparación de las sensibilidades de la dilución de los genotipos del VHC

DO con:						
Genotipo	Dilución	NS3NS4a PI	MEFA 7.1 + NS3NS4a PI	MEFA 7.2 + NS3NS4a PI	Ortho HCV 3.0	Monolisa Ver 2 Pasteur
1b	1:5.000	1,929	1,396	2,074	0,393	0,218
	1:10.000	1,506	0,826	1,699	0,159	0,084
	1:20.000	0,382	0,355	0,403	0,045	0,028
2a/c	1:5.000	0,868	0,717	0,917	0,136	0,782
	1:10.000	0,386	0,312	0,395	0,049	0,286
3a	1:5.000	1,879	0,964	1,622	0,218	0,353
	1:10.000	0,676	0,432	0,873	0,067	0,164

4a	1:5.000 1:10.000	1,392 1,169	0,824 0,265	1,752 0,717	0,193 0,0369	0,181 0,076
5a	1:5.000 1:10.000 1:20.000	2,889 1,317 0,715	1,763 1,036 0,416	2,744 1,587 0,726	0,827 0,316 0,097	0,988 0,395 0,120
6	1:5.000 1:10.000	2,978 2,841	2,455 0,984	3,224 1,192	2,863 0,380	ND[a] ND
AQ:L [a]ND, no determinado						

TABLA 6. Resumen del estudio de 17 paneles de seroconversión

Panel	Anticuerpo predominante[a]	Genotipo[a]	Días por delante del ensayo con licencia[b]
PHV 904	NS3	1a	2
PHV 905	NS3	1a	7
PHV 908	NS3	3	8
PHV 914	NS3, núcleo	2b	12
VHC 6212	NS3	Desconocido	14
VHC 6213	NS3	Desconocido	6
VHC 6214	NS3	Desconocido	7
VHC 6222	NS3	Desconocido	4
SC-0040	NS3	2b	9
PHV 913	Núcleo	2b	>2
PHV 907	Núcleo	1b	3
PHV 909	Núcleo	3	0[c]
PHV 910	Núcleo	1b	0
PHV 911	Núcleo	1a	0[c]
PHV 912	Núcleo	2b/3	0
SC-0030	Núcleo	1a	5
SC-0010	Núcleo	3a	0[c]
[a]Datos proporcionados por los proveedores del panel del VHC.			

[b]Comparación de la sensibilidad del ensayo usando MEFA 7.1 en combinación con NS3NS4a PI frente al ensayo con licencia actualmente, el sistema de ensayo Ortho HCV Versión 3.0 ELISA Test System o Abbott PRISM. [c] Intervalos de extracciones entre el cambio de negativos a los anticuerpos a positivos a los anticuerpos: 28 días para PHV 909, 11 días para PHV 911 y 7 días para el panel de SC-0010.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CHIRON CORPORATION

<120> ANTÍGENOS DE FUSIÓN DE MÚLTIPLES EPÍTOPOS DEL VHC CON SITIOS PARA ESCISIÓN PROTEOLÍTICA MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 2300-23466.40 (PPO 23466.0003)

<150> 60/621,790

<151> 2004-10-25

<150> 60/621,502

<151> 25-10-2004

<150> 60/618,390

<151> 12-10-2004

<150> 60/604,858

<151> 27-08-2004

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 3297

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> MEFA 7.1

<400> 1

atggctacaa aggctgtttg tgttttgaag ggtgacggcc cagttcaagg tattattaac
60

ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aaggtgtggg gaagcattaa aggactgact
120

gaaggcctgc atggattcca tgttcatgag tttggagata atacagcagg ctgtaccagt
180

gcaggtcctc actttaatcc tctatccaga aaacacggtg ggccaaagga tgaagagagg
240

catgttggag acttgggcaa tgtgactgct gacaaagatg gtgtggccga tgtgtctatt
300

gaagattctg tgatctcact ctcaggagac cattgcatca ttggccgcac actggtggtc
360

catgaaaaag cagatgactt gggcaaaggt ggaaatgaag aaagtacaaa gacaggaaac
420

gctggaagtc gtttggcttg tggtgtaatt gggatcgccc agaatttgaa ttctggttgc
480

aattgctcta tctatcccgg ccatataacg ggtcaccgca tggcatggaa gcttggttcc
540

gccgccagaa ctacctcggg ctttgtctcc ttgttcgccc caggtgccaa acaaaacgaa
600

actcacgtca cgggaggcgc agccgcccga actacgtctg ggttgacctc tttgttctcc
660

ccaggtgcca gccaaaacat tcaattgatt gtcgacttta tccctgtgga gaacctagag
720

acaaccatgc gatctccggt gttcacggat aactcctctc caccagtagt gccccagagc
780

ttccaggtgg ctcacctcca tgctcccaca ggcagcggca aaagcaccaa ggtcccggct
840

gcatatgcag ctcagggcta taaggtgcta gtactcaacc cctctgttgc tgcaacactg
900

ggctttggtg cttacatgtc caaggctcat gggatcgatc ctaacatcag gaccggggtg
960

agaacaatta ccactggcag ccccatcacg tactccacct acggcaagtt ccttgccgac
1020

ggcgggtgct cgggggggcgc ttatgacata ataatttgtg acgagtgcca ctccacggat
1080

gccacatcca tcttgggcat tggcactgtc cttgaccaag cagagactgc gggggcgaga
1140

ctggttgtgc tcgccaccgc caccctccg ggctccgtca ctgtgcccca tcccaacatc
1200

gaggaggttg ctctgtccac caccggagag atccctttt acggcaaggc tatccccctc
1260

gaagtaatca agggggggag acatctcatc ttctgtcatt caaagaagaa gtgcgacgaa
1320

ctcgccgcaa agctggtcgc attgggcatc aatgccgtgg cctactaccg cggtcttgac
1380

gtgtccgtca tcccgaccag cggcgatgtt gtcgtcgtgg caaccgatgc cctcatgacc
1440

ggctataccg gcgacttcga ctcggtgata gactgcaata cgtgtgtcac ccagacagtc
1500

gatttcagcc ttgaccctac cttcaccatt gagacaatca cgctccccca agatgctgtc
1560

tcccgcactc aacgtcgggg caggactggc agggggaagc caggcatcta cagatttgtg
1620

gcaccggggg agcgcccctc cggcatgttc gactcgtccg tcctctgtga gtgctatgac
1680

gcaggctgtg cttggtatga gctcacgccc gccgagacta cagttaggct acgagcgtac
1740

atgaacaccc cggggcttcc cgtgtgccag gaccatcttg aattttggga gggcgtcttt
1800

acaggcctca ctcatataga tgcccacttt ctatcccaga caaagcagag tggggagaac
1860

cttccttacc tggtagcgta ccaagccacc gtgtgcgcta gggctcaagc ccctccccca
1920

tcgtgggacc agatgtggaa gtgtttgatt cgcctcaagc ccaccctcca tgggccaaca
1980

cccctgctat acagactggg cgctgttcag aatgaaatca ccctgacgca cccagtcacc
2040

aaatacatca tgacatgcat gtcggccgac ctggaggtcg tcacgagcgc atgctccggg
2100

aagccggcaa tcatacctga cagggaagtc ctctaccgag agttcgatga gatggaagag
2160

tgctctcagc acttaccgta catcgagcaa gggatgatgc tcgccgagca gttcaagcag
2220

aaggccctcg gcctctcgcg agggggcaag ccggcaatcg ttccagacaa agaggtgttg
2280

tatcaacaat acgatgagat ggaagagtgc tcacaagctg ccccatatat cgaacaagct
2340

caggtaatag ctcaccagtt caaggaaaaa gtccttggat tgatcgataa tgatcaagtg
2400

gttgtgactc ctgacaaaga aatcttatat gaggcctttg atgagatgga agaatgcgcc
2460

tccaaagccg ccctcattga ggaagggcag cggatggcgg agatgctcaa gtctaagata
2520

caaggcctcc tcgggatact gcgccggcac gttggtcctg gcgaggggcc agtgcagtgg
2580

atgaaccggc tgatagcctt cgcctccaga gggaaccatg tttccccac gcactacgtt
2640

ccgtctagat cccggagatt cgcccaggcc ctgcccgttt gggcgcggcc ggactataac
2700

cccccgctag tggagacgtg gaaaaagccc gactacgaac cacctgtggt ccacggcaga
2760

tcttctcgga gattcgccca ggccctgccc gtttgggcgc ggccggacta taacccccg
2820

ctagtggaga cgtggaaaaa gcccgactac gaaccacctg tggtccatgg cagaaagacc
2880

aaacgtaaca ccaaccggcg gccgcaggac gtcaagttcc cgggtggcgg tcagatcgtt
2940

ggtcgcaggg gccctcctat ccccaaggct cgtcggcccg agggcaggac ctgggctcag
3000

cccggttacc cttggcccct ctatggcaat aaggacagac ggtctacagg taagtcctgg
3060

ggtaagccag ggtacccttg gccaagaaag accaaacgta acaccaaccg acggccgcag
3120

gacgtcaagt tcccgggtgg cggtcagatc gttggtcgca ggggccctcc tatccccaag
3180

gctcgtcggc ccgagggcag gacctgggct cagcccggtt acccttggcc cctctatggc
3240

aataaggaca gacggtctac cggtaagtcc tggggtaagc cagggtatcc ttggccc
3297

<210> 2

<211> 1099

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> MEFA 7.1

<400> 2

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

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

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

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

Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg
65                  70                  75                  80

His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala
                85                  90                  95

Asp Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys
            100                 105                 110

Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly
        115                 120                 125
```

```
Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg
    130                 135                 140

Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln Asn Leu Asn Ser Gly Cys
145                 150                 155                 160

Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
                165                 170                 175

Lys Leu Gly Ser Ala Ala Arg Thr Thr Ser Gly Phe Val Ser Leu Phe
            180                 185                 190

Ala Pro Gly Ala Lys Gln Asn Glu Thr His Val Thr Gly Gly Ala Ala
        195                 200                 205

Ala Arg Thr Thr Ser Gly Leu Thr Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ala Ser
    210                 215                 220

Gln Asn Ile Gln Leu Ile Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu
225                 230                 235                 240

Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val
                245                 250                 255

Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser
            260                 265                 270

Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys
        275                 280                 285

Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala
    290                 295                 300

Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val
305                 310                 315                 320

Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys
                325                 330                 335

Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile
            340                 345                 350

Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly
        355                 360                 365

Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu
```

370 375 380

Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile
385 390 395 400

Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys
405 410 415

Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys
420 425 430

His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu
435 440 445

Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile
450 455 460

Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr
465 470 475 480

Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val
485 490 495

Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr
500 505 510

Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg
515 520 525

Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu
530 535 540

Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp
545 550 555 560

Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg
565 570 575

Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His
580 585 590

Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala
595 600 605

His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr Leu
610 615 620

```
Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro
625                 630                 635                 640

Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu
                645                 650                 655

His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu
            660                 665                 670

Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser
        675                 680                 685

Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Ala Cys Ser Gly Lys Pro Ala Ile
    690                 695                 700

Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu
705                 710                 715                 720

Cys Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu
                725                 730                 735

Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Ser Arg Gly Gly Lys Pro Ala
            740                 745                 750

Ile Val Pro Asp Lys Glu Val Leu Tyr Gln Gln Tyr Asp Glu Met Glu
        755                 760                 765

Glu Cys Ser Gln Ala Ala Pro Tyr Ile Glu Gln Ala Gln Val Ile Ala
    770                 775                 780

His Gln Phe Lys Glu Lys Val Leu Gly Leu Ile Asp Asn Asp Gln Val
785                 790                 795                 800

Val Val Thr Pro Asp Lys Glu Ile Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu Met
                805                 810                 815

Glu Glu Cys Ala Ser Lys Ala Ala Leu Ile Glu Glu Gly Gln Arg Met
            820                 825                 830

Ala Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly Leu Leu Gly Ile Leu Arg
        835                 840                 845

Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu
    850                 855                 860
```

```
Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val
865                 870                 875                 880

Pro Ser Arg Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg
                885                 890                 895

Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro Asp Tyr
            900                 905                 910

Glu Pro Pro Val Val His Gly Arg Ser Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala
        915                 920                 925

Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr
    930                 935                 940

Trp Lys Lys Pro Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly Arg Lys Thr
945                 950                 955                 960

Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly
                965                 970                 975

Gly Gln Ile Val Gly Arg Arg Gly Pro Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg
            980                 985                 990

Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln  Pro Gly Tyr Pro Trp  Pro Leu Tyr
        995                 1000                1005

Gly Asn  Lys Asp Arg Arg Ser  Thr Gly Lys Ser Trp  Gly Lys Pro
    1010                1015                1020

Gly Tyr  Pro Trp Pro Arg Lys  Thr Lys Arg Asn Thr  Asn Arg Arg
    1025                1030                1035

Pro Gln  Asp Val Lys Phe Pro  Gly Gly Gly Gln Ile  Val Gly Arg
    1040                1045                1050

Arg Gly  Pro Pro Ile Pro Lys  Ala Arg Arg Pro Glu  Gly Arg Thr
    1055                1060                1065

Trp Ala  Gln Pro Gly Tyr Pro  Trp Pro Leu Tyr Gly  Asn Lys Asp
    1070                1075                1080

Arg Arg  Ser Thr Gly Lys Ser  Trp Gly Lys Pro Gly  Tyr Pro Trp
    1085                1090                1095

Pro
```

<210> 3

<211> 3297

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> MEFA 7.2

<400> 3

atggctacaa aggctgtttg tgttttgaag ggtgacggcc cagttcaagg tattattaac
60

ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aaggtgtggg gaagcattaa aggactgact
120

gaaggcctgc atggattcca tgttcatgag tttggagata atacagcagg ctgtaccagt
180

gcaggtcctc actttaatcc tctatccaga aaacacggtg ggccaaagga tgaagagagg
240

catgttggag acttgggcaa tgtgactgct gacaaagatg gtgtggccga tgtgtctatt
300

gaagattctg tgatctcact ctcaggagac cattgcatca ttggccgcac actggtggtc
360

catgaaaaag cagatgactt gggcaaaggt ggaaatgaag aaagtacaaa gacaggaaac
420

gctggaagtc gtttggcttg tggtgtaatt gggatcgccc agaatttgaa ttctggttgc
480

aattgctcta tctatcccgg ccatataacg ggtcaccgca tggcatggaa gcttggttcc
540

gccgccagaa ctacctcggg ctttgtctcc ttgttcgccc caggtgccaa acaaaacgaa
600

actcacgtca cgggaggcgc agccgcccga actacgtctg ggttgacctc tttgttctcc
660

ccaggtgcca gccaaaacat tcaattgatt gtcgacttta tccctgtgga gaacctagag
720

acaaccatgc gatctccggt gttcacggat aactcctctc caccagtagt gccccagagc
780

ttccaggtgg ctcacctcca tgctcccaca ggcagcggca aaagcaccaa ggtcccggct
840

gcatatgcag ctcagggcta taaggtgcta gtactcaacc cctctgttgc tgcaacactg
900

ggctttggtg cttacatgtc caaggctcat gggatcgatc ctaacatcag gaccggggtg
960

agaacaatta ccactggcag ccccatcacg tactccacct acggcaagtt ccttgccgac
1020

ggcgggtgct cgggggggcgc ttatgacata ataatttgtg acgagtgcca ctccacggat
1080

gccacatcca tcttgggcat tggcactgtc cttgaccaag cagagactgc gggggcgaga
1140

ctggttgtgc tcgccaccgc caccċctccg ggctccgtca ctgtgcccca tcccaacatc
1200

gaggaggttg ctctgtccac caccggagag atccctttttt acggcaaggc tatccccctc
1260

gaagtaatca agggggggag acatctcatc ttctgtcatt caaagaagaa gtgcgacgaa
1320

ctcgccgcaa agctggtcgc attgggcatc aatgccgtgg cctactaccg cggtcttgac
1380

gtgtccgtca tcccgctgcc cggcgatgtt gtcgtcgtgg caaccgatgc cctcatgacc
1440

ggctataccg gcgacttcga ctcggtgata gactgcctgc cctgtgtcac ccagacagtc
1500

gatttcagcc ttgaccctac cttcaccatt gagacaatca cgctccccca agatgctgtc
1560

tcccgcactc aacgtcgggg caggactggc agggggaagc caggcatcta cagatttgtg
1620

gcaccgggggg agcgcccctc cggcatgttc gactcgtccg tcctctgtga gtgctatgac
1680

gcaggctgtg cttggtatga gctcacgccc gccgagacta cagttaggct acgagcgtac
1740

atgaacaccc cggggcttcc cgtgtgccag gaccatcttg aattttggga gggcgtcttt
1800

acaggcctca ctcatataga tgcccacttt ctatcccaga caaagcagag tggggagaac
1860

cttccttacc tggtagcgta ccaagccacc gtgtgcgcta gggctcaagc ccctccccca
1920

tcgtgggacc agatgtggaa gtgtttgatt cgcctcaagc ccaccctcca tgggccaaca
1980

cccctgctat acagactggg cgctgttcag aatgaaatca ccctgacgca cccagtcacc
2040

aaatacatca tgacatgcat gtcggccgac ctggaggtcg tcctgcccgc atgctccggg
2100

aagccggcaa tcatacctga cagggaagtc ctctaccgag agttcgatga gatggaagag
2160

cccattcagc acttaccgta catcgagcaa gggatgatgc tcgccgagca gttcaagcag
2220

aaggccctcg gcctctcgcg agggggcaag ccggcaatcg ttccagacaa agaggtgttg
2280

tatcaacaat acgatgagat ggaagagcct atacaagctg ccccatatat cgaacaagct
2340

caggtaatag ctcaccagtt caaggaaaaa gtccttggat tgatcgataa tgatcaagtg
2400

gttgtgactc ctgacaaaga aatcttatat gaggcctttg atgagatgga agaaccaatc
2460

tccaaagccg ccctcattga ggaagggcag cggatggcgg agatgctcaa gtctaagata
2520

caaggcctcc tcgggatact gcgccggcac gttggtcctg gcgaggggggc agtgcagtgg
2580

atgaaccggc tgatagcctt cgcctccaga gggaaccatg tttcccccac gcactacgtt
2640

ccgtctagat cccggagatt cgcccaggcc ctgcccgttt gggcgcggcc ggactataac
2700

cccccgctag tggagacgtg gaaaaagccc gactacgaac cacctgtggt ccacggcaga
2760

tcttctcgga gattcgccca ggccctgccc gtttgggcgc ggccggacta taacccccccg
2820

ctagtggaga cgtggaaaaa gcccgactac gaaccacctg tggtccatgg cagaaagacc
2880

aaacgtaaca ccaaccggcg gccgcaggac gtcaagttcc cgggtggcgg tcagatcgtt
2940

ggtcgcaggg gccctcctat ccccaaggct cgtcggcccg agggcaggac ctgggctcag
3000

cccggttacc cttggccccct ctatggcaat aaggacagac ggtctacagg taagtcctgg
3060

ggtaagccag ggtacccttg gccaagaaag accaaacgta acaccaaccg acggccgcag
3120

gacgtcaagt tcccgggtgg cggtcagatc gttggtcgca ggggccctcc tatccccaag
3180

gctcgtcggc ccgagggcag gacctgggct cagcccggtt acccttggcc cctctatggc
3240

aataaggaca gacggtctac cggtaagtcc tggggtaagc cagggtatcc ttggccc
3297

<210> 4

<211> 1099

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> MEFA 7.2

<400> 4

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

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

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

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

Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg
65                  70                  75                  80

His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala
                85                  90                  95

Asp Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys
            100                 105                 110

Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly
        115                 120                 125

Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg
    130                 135                 140

Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln Asn Leu Asn Ser Gly Cys
145                 150                 155                 160

Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
                165                 170                 175

Lys Leu Gly Ser Ala Ala Arg Thr Thr Ser Gly Phe Val Ser Leu Phe
            180                 185                 190

Ala Pro Gly Ala Lys Gln Asn Glu Thr His Val Thr Gly Gly Ala Ala
        195                 200                 205

Ala Arg Thr Thr Ser Gly Leu Thr Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ala Ser
    210                 215                 220
```

```
Gln Asn Ile Gln Leu Ile Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu
225                 230                 235                 240

Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val
                245                 250                 255

Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser
            260                 265                 270

Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys
        275                 280                 285

Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala
    290                 295                 300

Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val
305                 310                 315                 320

Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys
                325                 330                 335

Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile
            340                 345                 350

Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly
        355                 360                 365

Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu
    370                 375                 380

Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile
385                 390                 395                 400

Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys
                405                 410                 415

Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys
            420                 425                 430

His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu
        435                 440                 445

Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile
    450                 455                 460
```

```
Pro Leu Pro Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr
465                 470                 475                 480

Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Leu Pro Cys Val
                485                 490                 495

Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr
            500                 505                 510

Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg
        515                 520                 525

Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu
    530                 535                 540

Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp
545                 550                 555                 560

Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg
                565                 570                 575

Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His
            580                 585                 590

Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala
        595                 600                 605

His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr Leu
    610                 615                 620

Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro
625                 630                 635                 640

Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu
                645                 650                 655

His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu
            660                 665                 670

Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser
        675                 680                 685

Ala Asp Leu Glu Val Val Leu Pro Ala Cys Ser Gly Lys Pro Ala Ile
    690                 695                 700
```

```
Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu
705                 710                 715                 720

Pro Ile Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu
                725                 730                 735

Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Ser Arg Gly Gly Lys Pro Ala
            740                 745                 750

Ile Val Pro Asp Lys Glu Val Leu Tyr Gln Gln Tyr Asp Glu Met Glu
        755                 760                 765

Glu Pro Ile Gln Ala Ala Pro Tyr Ile Glu Gln Ala Gln Val Ile Ala
    770                 775                 780

His Gln Phe Lys Glu Lys Val Leu Gly Leu Ile Asp Asn Asp Gln Val
785                 790                 795                 800

Val Val Thr Pro Asp Lys Glu Ile Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu Met
                805                 810                 815

Glu Glu Pro Ile Ser Lys Ala Ala Leu Ile Glu Glu Gly Gln Arg Met
            820                 825                 830

Ala Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly Leu Leu Gly Ile Leu Arg
        835                 840                 845

Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu
    850                 855                 860

Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val
865                 870                 875                 880

Pro Ser Arg Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg
                885                 890                 895

Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro Asp Tyr
            900                 905                 910

Glu Pro Pro Val Val His Gly Arg Ser Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala
        915                 920                 925

Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr
    930                 935                 940

Trp Lys Lys Pro Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly Arg Lys Thr
```

945 950 955 960

Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly
965 970 975

Gly Gln Ile Val Gly Arg Arg Gly Pro Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg
980 985 990

Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr
995 1000 1005

Gly Asn Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro
1010 1015 1020

Gly Tyr Pro Trp Pro Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg
1025 1030 1035

Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Arg
1040 1045 1050

Arg Gly Pro Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr
1055 1060 1065

Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Lys Asp
1070 1075 1080

Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly Tyr Pro Trp
1085 1090 1095

Pro

<210> 5

<211> 2058

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> un antígeno conformacional NS3/4a representativo (NS3/4a PI)

<400> 5

atggcgccca tcacggcgta cgcccagcag acaaggggcc tcctagggtg cataatcacc 60

agcctaactg gccgggacaa aaaccaagtg gagggtgagg tccagattgt gtcaactgct 120

gcccaaacct tcctggcaac gtgcatcaat ggggtgtgct ggactgtcta ccacggggcc 180

ggaacgagga ccatcgcgtc acccaagggt cctgtcatcc agatgtatac caatgtagac
240

caagaccttg tgggctggcc cgctccgcaa ggtagccgat cattgacacc ctgcacttgc
300

ggctcctcgg acctttacct ggtcacgagg cacgccgatg tcattcccgt gcgccggcgg
360

ggtgatagca ggggcagcct gctgtcgccc cggcccattt cctacttgaa aggctcctcg
420

gggggtccgc tgttgtgccc cgcggggcac gccgtgggca tatttagggc cgcggtgtgc
480

acccgtggag tggctaaggc ggtggacttt atccctgtgg agaacctaga gacaaccatg
540

aggtccccgg tgttcacgga taactcctct ccaccagtag tgccccagag cttccaggtg
600

gctcacctcc atgctcccac aggcagcggc aaaagcacca aggtcccggc tgcatatgca
660

gctcagggct ataaggtgct agtactcaac ccctctgttg ctgcaacact gggctttggt
720

gcttacatgt ccaaggctca tgggatcgat cctaacatca ggaccggggt gagaacaatt
780

accactggca gccccatcac gtactccacc tacggcaagt tccttgccga cggcgggtgc
840

tcgggggcg cttatgacat aataatttgt gacgagtgcc actccacgga tgccacatcc
900

atcttgggca ttggcactgt ccttgaccaa gcagagactg cgggggcgag actggttgtg
960

ctcgccaccg ccacccctcc gggctccgtc actgtgcccc atcccaacat cgaggaggtt
1020

gctctgtcca ccaccggaga gatccctttt tacggcaagg ctatcccccc cgaagtaatc
1080

aaggggggga gacatctcat cttctgtcat tcaaagaaga agtgcgacga actcgccgca
1140

aagctggtcg cattgggcat caatgccgtg gcctactacc gcggtcttga cgtgtccgtc
1200

atcccgccca tcggcgatgt tgtcgtcgtg gcaaccgatg ccctcatgac cggctatacg
1260

ggcgacttcg actcggtgat agactgcaat acgtgtgtca cccagacagt cgatttcagc
1320

cttgacccta ccttcaccat tgagacaatc acgctccccc aagatgctgt ctcccgcact
1380

caacgtcggg gcaggactgg caggggaag ccaggcatct acagatttgt ggcaccgggg
1440

gagcgcccct ccggcatgtt cgactcgtcc gtcctctgtg agtgctatga cgcaggctgt
1500

gcttggtatg agctcacgcc cgccgagact acagttaggc tacgagcgta catgaacacc
1560

ccggggcttc ccgtgtgcca ggaccatctt gaattttggg agggcgtctt tacaggcctc
1620

actcatatag atgcccactt tctatcccag acaaagcaga gtggggagaa ccttccttac
1680

ctggtagcgt accaagccac cgtgtgcgct agggctcaag cccctccccc atcgtgggac
1740

cagatgtgga agtgtttgat tcgcctcaag cccaccctcc atgggccaac acccctgcta
1800

tacagactgg gcgctgttca gaatgaaatc accctgacgc acccagtcac caaatacatc
1860

atgacatgca tgtcggccga cctggaggtc gtcacgagca cctgggtgct cgttggcggc
1920

gtcctggctg ctttggccgc gtattgcctg tcaacaggct gcgtggtcat agtgggcagg
1980

gtcgtcttgt ccgggaagcc ggcaatcata cctgacaggg aagtcctcta ccgagagttc
2040

gatgagatgg aagagtgc
2058

<210> 6

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> un antígeno conformacional NS3/4a representativo (NS3/4a PI)

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro
            180                 185                 190

Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
        195                 200                 205

Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
    210                 215                 220

Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly
225                 230                 235                 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
                245                 250                 255

Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
            260                 265                 270

Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
        275                 280                 285

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

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

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
                325                 330                 335

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

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

Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
    370                 375                 380
Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
385                 390                 395                 400

Ile Pro Pro Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
```

405 410 415

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
565 570 575

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

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

Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
610 615 620

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

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
645 650 655

Ile Val Gly Arg Val Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
660 665 670

Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
675 680 685

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopos del VHC

<400> 7

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

Gly Ala Lys Gln Asn
            20
```

REIVINDICACIONES

1. Un antígeno modificado de fusión de múltiples epítopos (MEFA) del virus de la hepatitis C (VHC), en el que dicho MEFA comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % con la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 4, con la condición de que los aminoácidos en las posiciones 466, 467, 493, 494, 695, 696, 721, 722, 770, 771, 819 y 820, numeradas con respecto a la SEC ID Nº 4, mantengan los aminoácidos en las correspondientes posiciones de la SEC ID Nº 4.

2. El MEFA modificado de la reivindicación 1, comprendiendo dicho MEFA una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 90 % con la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 4.

3. El MEFA modificado de la reivindicación 1, comprendiendo dicho MEFA una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 98% con la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 4.

4. El MEFA modificado DE la reivindicación 1, comprendiendo dicho MEFA la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 4.

5. Un soporte sólido para inmunoensayo que comprende el MEFA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

6. El soporte sólido de inmunoensayo de la reivindicación 5, que comprende además al menos un epítopo conformacional NS3/4a del VHC, en el que dicho epítopo conformacional NS3/4a reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.

7. Un procedimiento para producir un soporte sólido para inmunoensayo, que comprende:

(a) proporcionar un soporte sólido; y

(b) unir al soporte sólido al menos un MEFA modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, que además comprende unir al soporte sólido en una posición discreta un epítopo conformacional NS3/4a del VHC, en el que el epítopo conformacional reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.

9. El procedimiento de la reivindicación 8 o el soporte sólido para inmunoensayo de la reivindicación 6, en el que el epítopo conformacional NS3/4a comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 6.

10. El procedimiento de la reivindicación 8 o el soporte sólido para inmunoensayo de la reivindicación 6, en el que el epítopo conformacional NS3/4a comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 6.

11. El procedimiento de la reivindicación 8 o el soporte sólido para inmunoensayo de la reivindicación 6, en el que el epítopo conformacional NS3/4a comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 98% con la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 6.

12. El procedimiento de la reivindicación 8 o el soporte sólido para inmunoensayo de la reivindicación 6, en el que el epítopo conformacional NS3/4a comprende la secuencia contigua de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 6.

13. El procedimiento de la reivindicación 8 o el soporte sólido para inmunoensayo de la reivindicación 6, en el que el epítopo conformacional NS3/4a consiste en la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 6.

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

(a) proporcionar un soporte sólido para inmunoensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 o 9-13;

(b) combinar una muestra biológica con dicho soporte sólido en condiciones que permitan que los anticuerpos del VHC, cuando estén presentes en la muestra biológica, se unan a dicho MEFA y a dicho epítopo conformacional NS3/4a si está presente, para formar un primer complejo inmunitario.

(c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones formadoras de complejo un anticuerpo marcado de forma que se pueda detectar, en el que el anticuerpo marcado reacciona con dicho complejo inmunitario;

(d) detectar segundos complejos inmunitarios formados entre el anticuerpo marcado de forma que se pueda detectar y el primer complejo inmunitario, si existe, como indicación de infección por VHC en la muestra biológica.

15. Un kit de ensayo para inmunodiagnóstico que comprende el soporte sólido para inmunoensayo de cualquiera de las

reivindicaciones 5, 6 o 9-13, e instrucciones para realizar el ensayo para inmunodiagnóstico.

16. Un polinucleótido que comprende una secuencia codificadora para el MEFA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

17. Un vector recombinante que comprende:

(a) un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 16;

(b) y elementos de control unidos operativamente a dicho polinucleótido de modo que la secuencia codificadora se pueda transcribir y traducir en una célula huésped.

18. Una célula huésped transformada con el vector recombinante de la reivindicación 17.

19. Un procedimiento para producir un MEFA recombinante, que comprende:

(a) proporcionar una población de células huésped de acuerdo con la reivindicación 18; y

(b) cultivar dicha población de células en condiciones mediante las cuales se expresa el antígeno de fusión de múltiples epítopos codificado por la secuencia codificadora presente en dicho vector recombinante.

Genoma del VHC y proteínas recombinantes

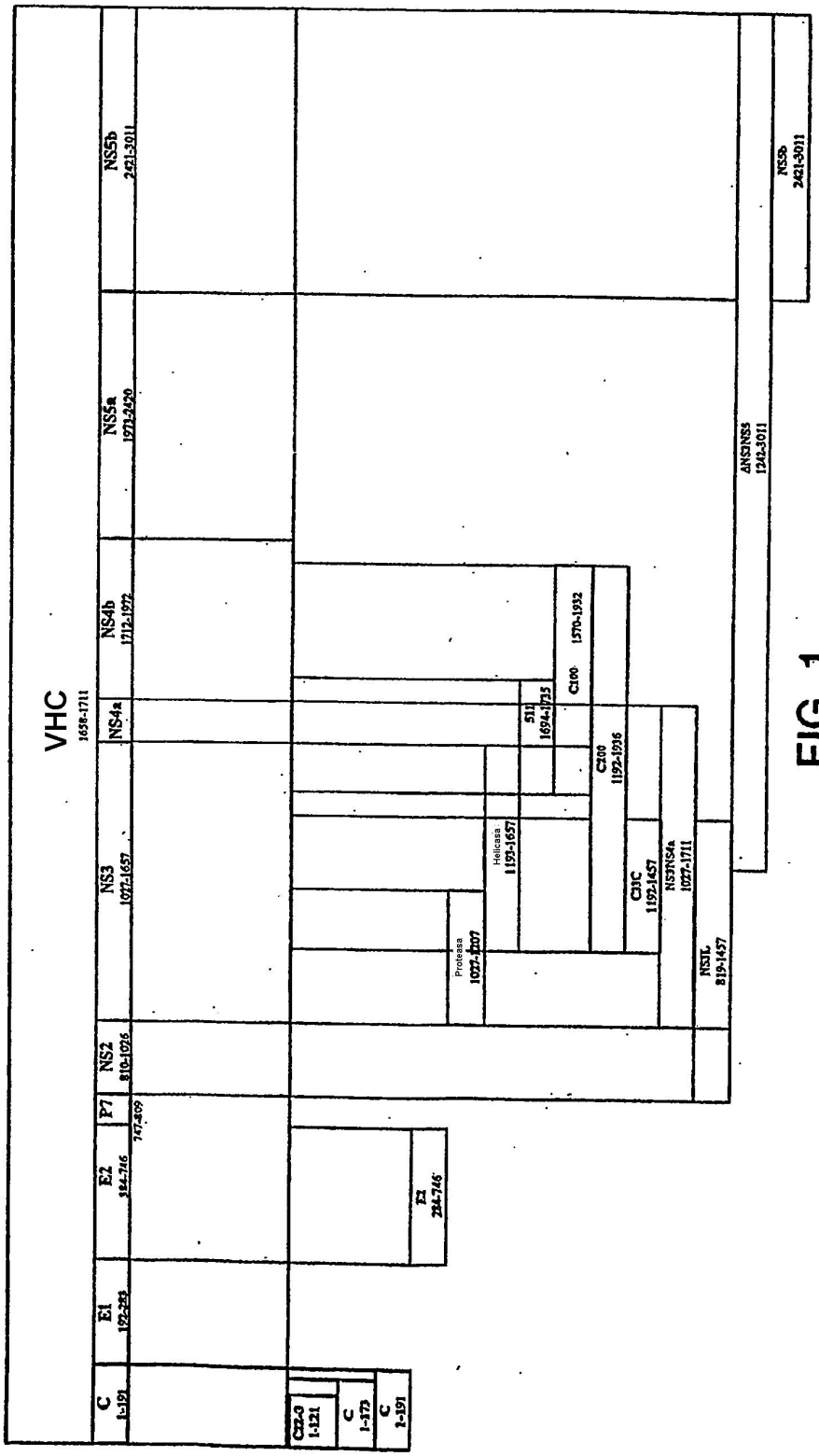


FIG. 1

FIG. 2

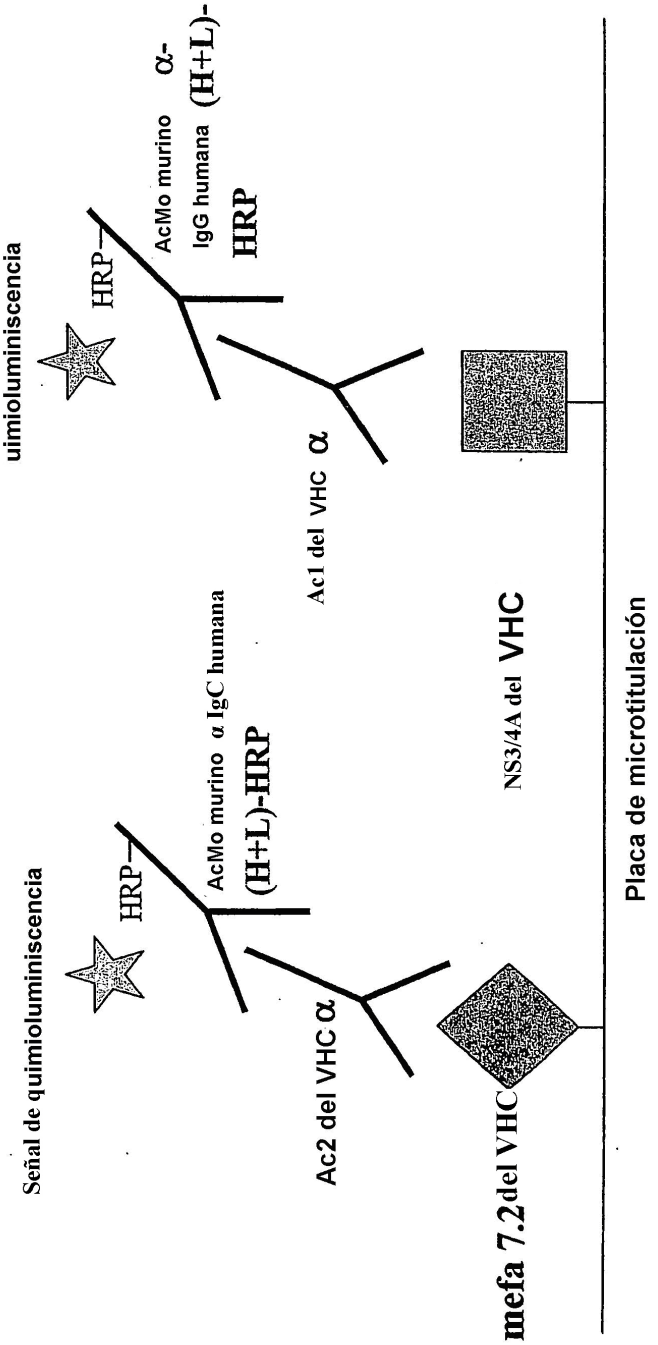
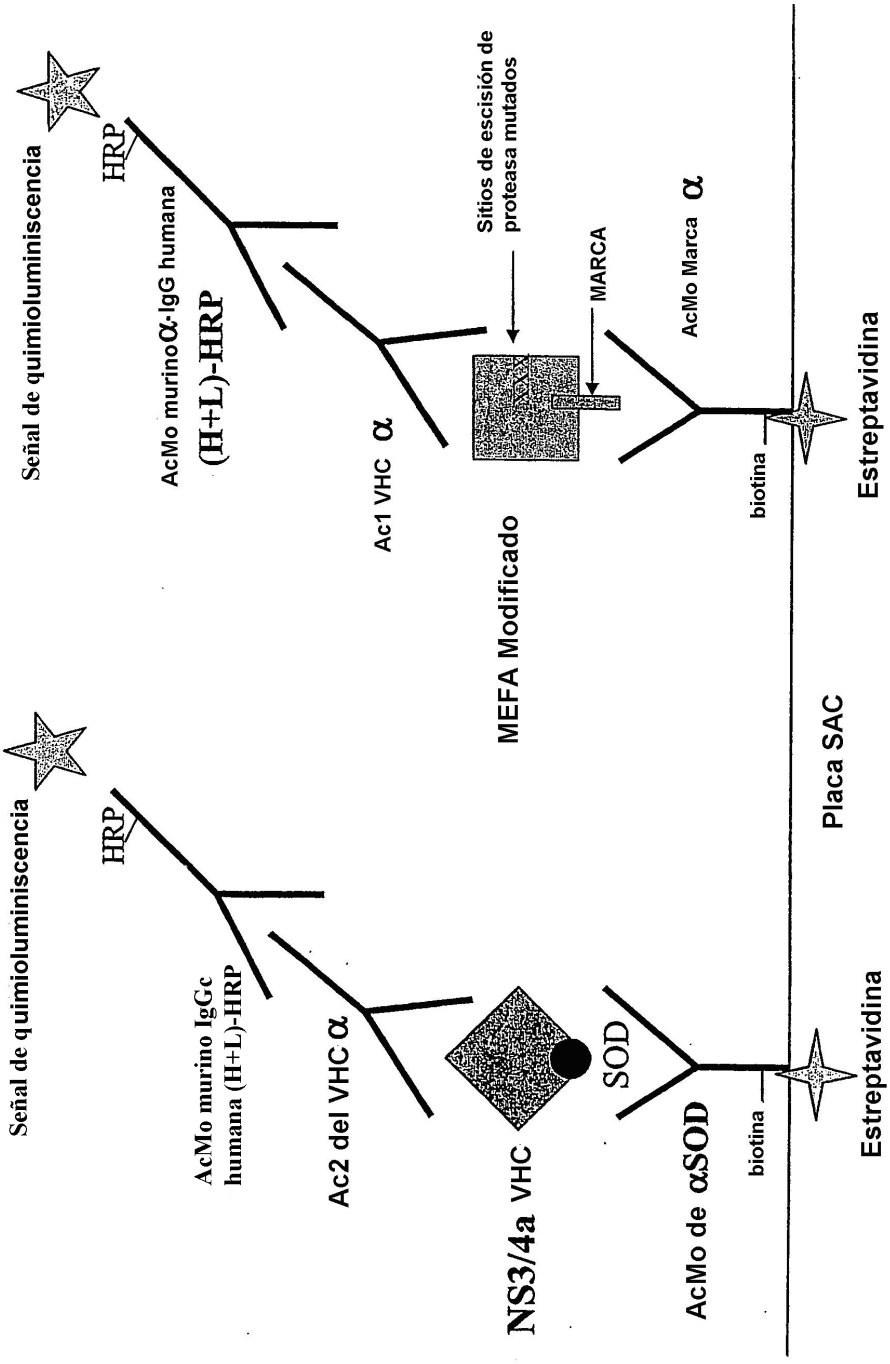

uimioluminiscencia
HRP
AcMo murino α-
IgG humana (H+L)-
HRP
Ac1 del VHC α
NS3/4A del VHC
Placa de microtitulación
Señal de quimioluminiscencia
HRP
AcMo murino α IgC humana
(H+L)-HRP
Ac2 del VHC α
mefa 7.2del VHC

FIG. 3


Señal de quimioluminiscencia
HRP
AcMo murino IgGc humana (H+L)-HRP
Ac2 del VHC α
NS3/4a VHC
SOD
AcMo de αSOD
biotina
Estreptavidina
Placa SAC
MEFA Modificado
Ac1 VHC α
AcMo murino α-IgG humana (H+L)-HRP
Sitios de escisión de proteasa mutados
MARCA
AcMo Marca α
biotina
Estreptavidina

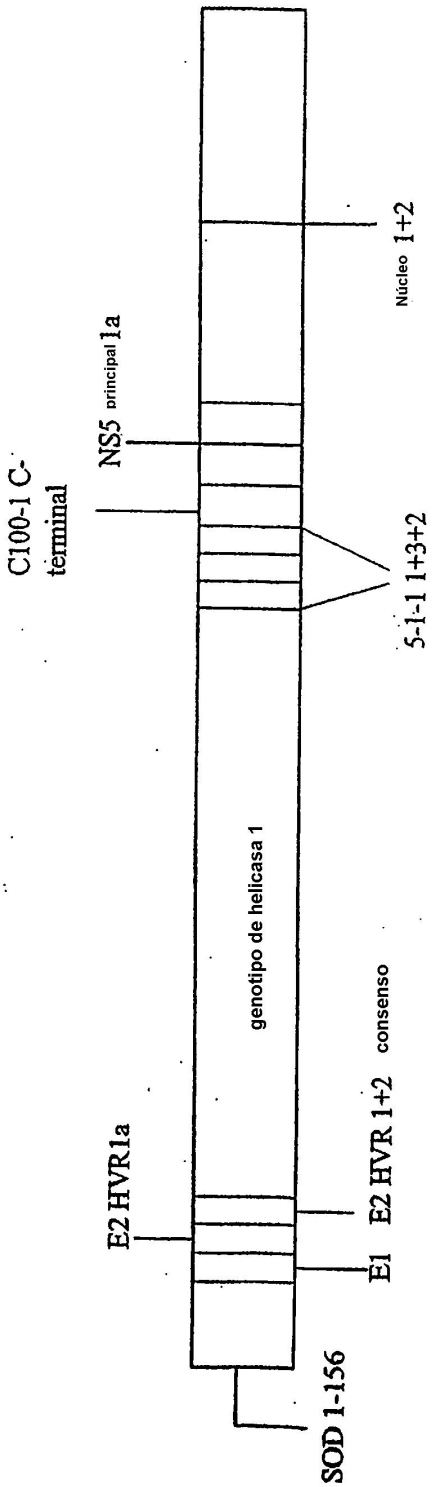

C100-1 C-terminal
NS5 principal 1a
Núcleo 1+2
5-1-1 1+3+2
genotipo de helicasa 1
E2 HVR1a
E1 E2 HVR 1+2 consenso
SOD 1-156

FIG. 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 5A

```
                  200                                                 210
 A   K   Q   N   E   T   H   V   T   G   G   A   A   A   R
GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA GCC GCC CGA

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

                  230                                                 240
 N   I   Q   L   I   V   D   F   I   P   V   E   N   L   E
AAC ATT CAA TTG ATT GTC GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC CTA GAG

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

                  260                                                 270
 V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A   P   T
GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA

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

                  290                                                 300
 G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A   T   L
GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA ACA CTG

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

                  320                                                 330
 I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P   I   T
ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC ATC ACG

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

                  350                                                 360
 G   A   Y   D   I   I   I   C   D   E   C   H   S   T   D
GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG GAT

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

                  380                                                 390
 T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T   P   P
ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC CCT CCG
```

FIG. 5B

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

                    410                                 420
 S   T   T   G   E   I   P   F   Y   G   K   A   I   P   L
TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC CCC CTC

                                                430
 E   V   I   K   G   G   R   H   L   I   F   C   H   S   K
GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG

                    440                                 450
 K   K   C   D   E   L   A   A   K   L   V   A   L   G   I
AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG GGC ATC

                                                460
 N   A   V   A   Y   Y   R   G   L   D   V   S   V   I   P
AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG

                    470                                 480
 T   S   G   D   V   V   V   V   A   T   D   A   L   M   T
ACC AGC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC ATG ACC

                                                490
 G   Y   T   G   D   F   D   S   V   I   D   C   N   T   C
GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT

                    500                                 510
 V   T   Q   T   V   D   F   S   L   D   P   T   F   T   I
GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT

                                                520
 E   T   I   T   L   P   Q   D   A   V   S   R   T   Q   R
GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT

                    530                                 540
 R   G   R   T   G   R   G   K   P   G   I   Y   R   F   V
CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA TTT GTG

                                                550
 A   P   G   E   R   P   S   G   M   F   D   S   S   V   L
GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC

                    560                                 570
 C   E   C   Y   D   A   G   C   A   W   Y   E   L   T   P
TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC

                                                580
 A   E   T   T   V   R   L   R   A   Y   M   N   T   P   G
GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG
```

FIG. 5C

```
                    590                                                 600
 L   P   V   C   Q   D   H   L   E   F   W   E   G   V   F
CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC GTC TTT

                                        610
 T   G   L   T   H   I   D   A   H   F   L   S   Q   T   K
ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG

                    620                                                 630
 Q   S   G   E   N   L   P   Y   L   V   A   Y   Q   A   T
CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC

                                        640
 V   C   A   R   A   Q   A   P   P   P   S   W   D   Q   M
GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC CAG ATG

                    650                                                 660
 W   K   C   L   I   R   L   K   P   T   L   H   G   P   T
TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG CCA ACA

                                        670
 P   L   L   Y   R   L   G   A   V   Q   N   E   I   T   L
CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG

                    680                                                 690
 T   H   P   V   T   K   Y   I   M   T   C   M   S   A   D
ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG GCC GAC

                                        700
 L   E   V   V   T   S   A   C   S   G   K   P   A   I   I
CTG GAG GTC GTC ACG AGC GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA

                    710                                                 720
 P   D   R   E   V   L   Y   R   E   F   D   E   M   E   E
CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG

                                        730
 C   S   Q   H   L   P   Y   I   E   Q   G   M   M   L   A
TGC TCT CAG CAC TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC

                    740                                                 750
 E   Q   F   K   Q   K   A   L   G   L   S   R   G   G   K
GAG CAG TTC AAG CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG

                                        760
 P   A   I   V   P   D   K   E   V   L   Y   Q   Q   Y   D
CCG GCA ATC GTT CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT

                    770                                                 780
 E   M   E   E   C   S   Q   A   A   P   Y   I   E   Q   A
GAG ATG GAA GAG TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT
```

FIG. 5D

```
                                        790
 Q   V   I   A   H   Q   F   K   E   K   V   L   G   L   I
CAG GTA ATA GCT CAC CAG TTC AAG GAA AAA GTC CTT GGA TTG ATC

                800                                     810
 D   N   D   Q   V   V   V   T   P   D   K   E   I   L   Y
GAT AAT GAT CAA GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT

                                        820
 E   A   F   D   E   M   E   E   C   A   S   K   A   A   L
GAG GCC TTT GAT GAG ATG GAA GAA TGC GCC TCC AAA GCC GCC CTC

                830                                     840
 I   E   E   G   Q   R   M   A   E   M   L   K   S   K   I
ATT GAG GAA GGG CAG CGG ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA

                                        850
 Q   G   L   L   G   I   L   R   R   H   V   G   P   G   E
CAA GGC CTC CTC GGG ATA CTG CGC CGG CAC GTT GGT CCT GGC GAG

                860                                     870
 G   A   V   Q   W   M   N   R   L   I   A   F   A   S   R
GGG GCA GTG CAG TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCC TTC GCC TCC AGA

                                        880
 G   N   H   V   S   P   T   H   Y   V   P   S   R   S   R
GGG AAC CAT GTT TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CGG

                890                                     900
 R   F   A   Q   A   L   P   V   W   A   R   P   D   Y   N
AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC

                                        910
 P   P   L   V   E   T   W   K   K   P   D   Y   E   P   P
CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT

                920                                     930
 V   V   H   G   R   S   S   R   R   F   A   Q   A   L   P
GTG GTC CAC GGC AGA TCT TCT CGG AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC

                                        940
 V   W   A   R   P   D   Y   N   P   P   L   V   E   T   W
GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG

                950                                     960
 K   K   P   D   Y   E   P   P   V   V   H   G   R   K   T
AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC

                                        970
 K   R   N   T   N   R   R   P   Q   D   V   K   F   P   G
AAA CGT AAC ACC AAC CGG CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT
```

FIG. 5E

```
                    980                                                 990
 G   G   Q   I   V   G   R   R   G   P   P   I   P   K   A
GGC GGT CAG ATC GTT GGT CGC AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT

                                        1000
 R   R   P   E   G   R   T   W   A   Q   P   G   Y   P   W
CGT CGG CCC GAG GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG

                    1010                                                1020
 P   L   Y   G   N   K   D   R   R   S   T   G   K   S   W
CCC CTC TAT GGC AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG

                                        1030
 G   K   P   G   Y   P   W   P   R   K   T   K   R   N   T
GGT AAG CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC

                    1040                                                1050
 N   R   R   P   Q   D   V   K   F   P   G   G   G   Q   I
AAC CGA CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC

                                        1060
 V   G   R   R   G   P   P   I   P   K   A   R   R   P   E
GTT GGT CGC AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG CCC GAG

                    1070                                                1080
 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

                                        1090
 N   K   D   R   R   S   T   G   K   S   W   G   K   P   G
AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACC GGT AAG TCC TGG GGT AAG CCA GGG

                1099
 Y   P   W   P
TAT CCT TGG CCC
```

FIG. 5F

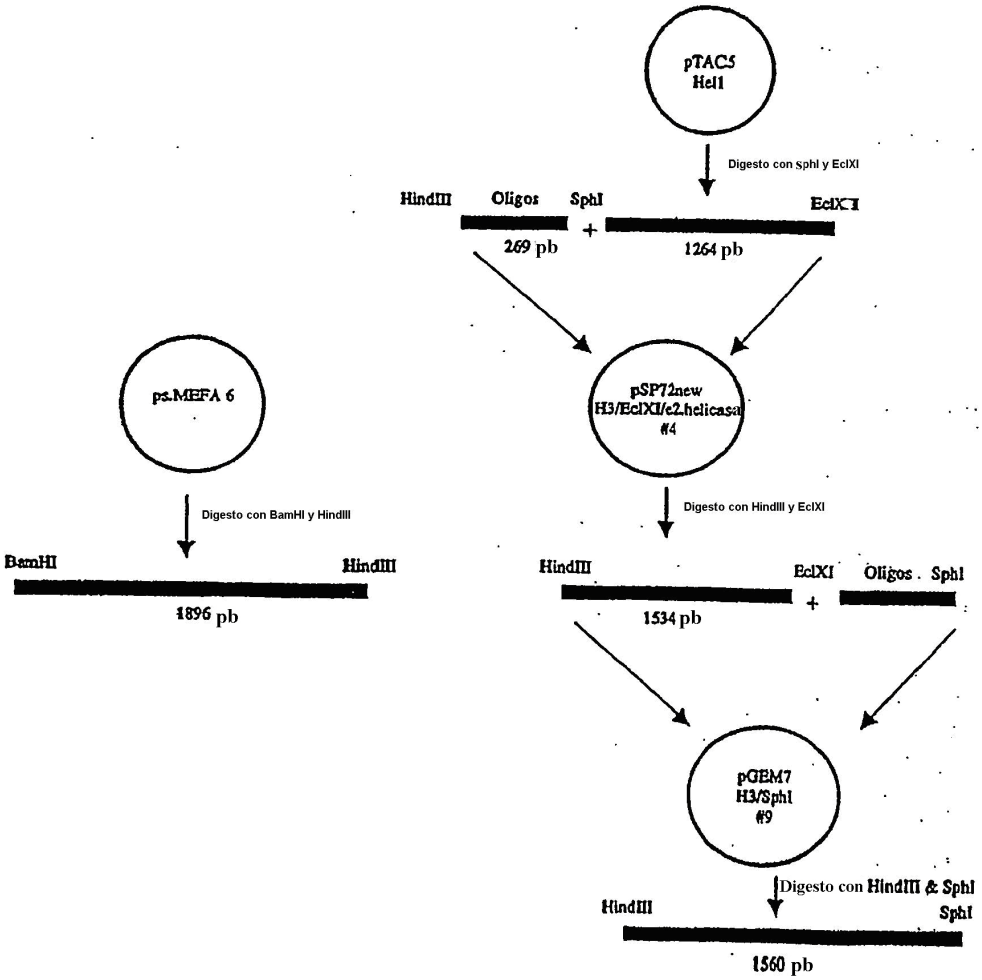

pTAC5
Hell
Digesto con SphI y EclXI
HindIII
Oligos
SphI
EclXI
269 pb
+
1264 pb
ps.MEFA 6
pSP72new
H3/EclXI/e2.helicasa
#4
Digesto con BamHI y HindIII
Digesto con HindIII y EclXI
BamHI
HindIII
1896 pb
HindIII
EclXI
Oligos . SphI
1534 pb
+
pGEM7
H3/SphI
#9
Digesto con HindIII & SphI
HindIII
SphI
1560 pb

FIG. 6A

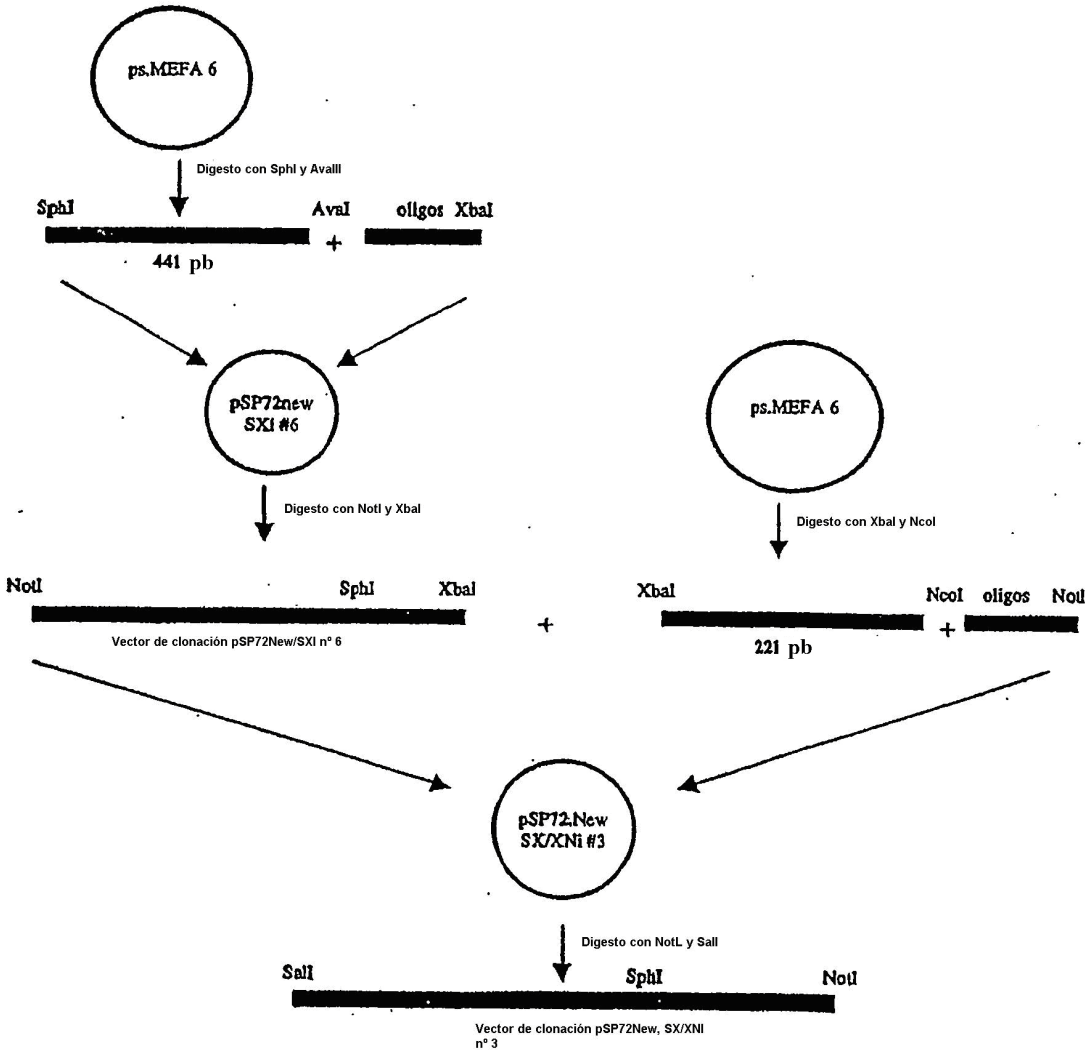

ps.MEFA 6
Digesto con SphI y AvaIII
SphI
AvaI
oligos XbaI
441 pb
pSP72new SXI #6
Digesto con NotI y XbaI
NotI
SphI
XbaI
Vector de clonación pSP72New/SXI nº 6
ps.MEFA 6
Digesto con XbaI y NcoI
XbaI
NcoI
oligos
NotI
221 pb
pSP72.New SX/XNi #3
Digesto con NotL y SalI
SalI
SphI
NotI
Vector de clonación pSP72New, SX/XNI nº 3

FIG. 6B

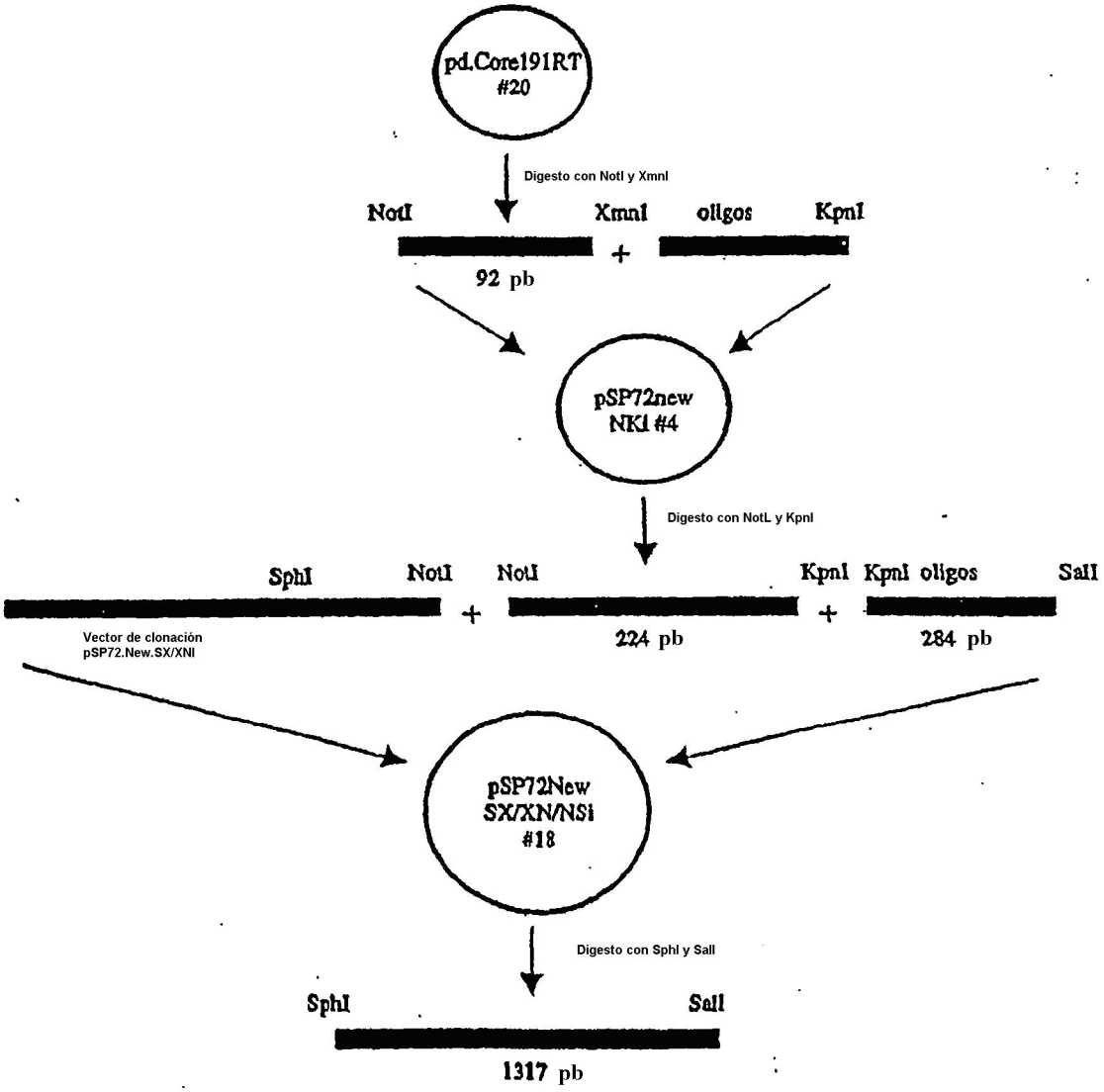

pd.Core191RT
#20
Digesto con NotI y XmnI
NotI
XmnI
oligos
KpnI
92 pb
pSP72new
NKI #4
Digesto con NotL y KpnI
SphI
NotI
NotI
KpnI
KpnI oligos
SalI
Vector de clonación
pSP72.New.SX/XNI
224 pb
284 pb
pSP72New
SX/XN/NSi
#18
Digesto con SphI y SalI
SphI
SalI
1317 pb

FIG. 6C

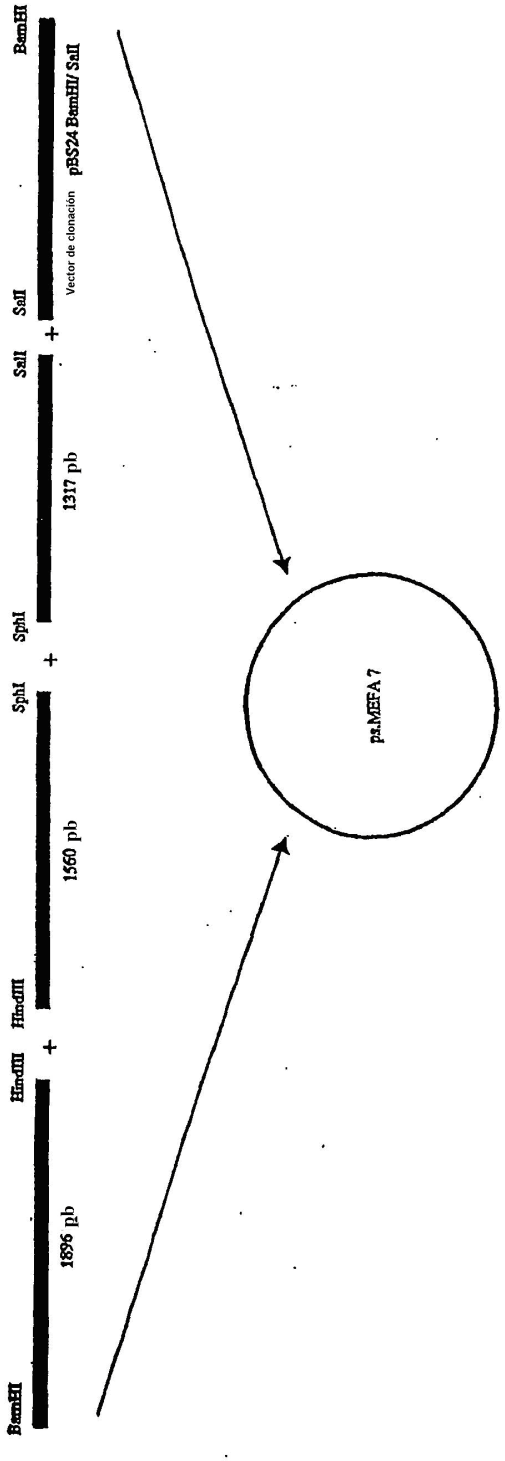

BamHI
HindIII
1896 pb
HindIII
HindIII
SphI
1560 pb
SphI
SphI
SalI
1317 pb
SalI
SalI
Vector de clonación pBS24 BamHI/ SalI
BamHI
pa.MEFA 7

FIG. 6D

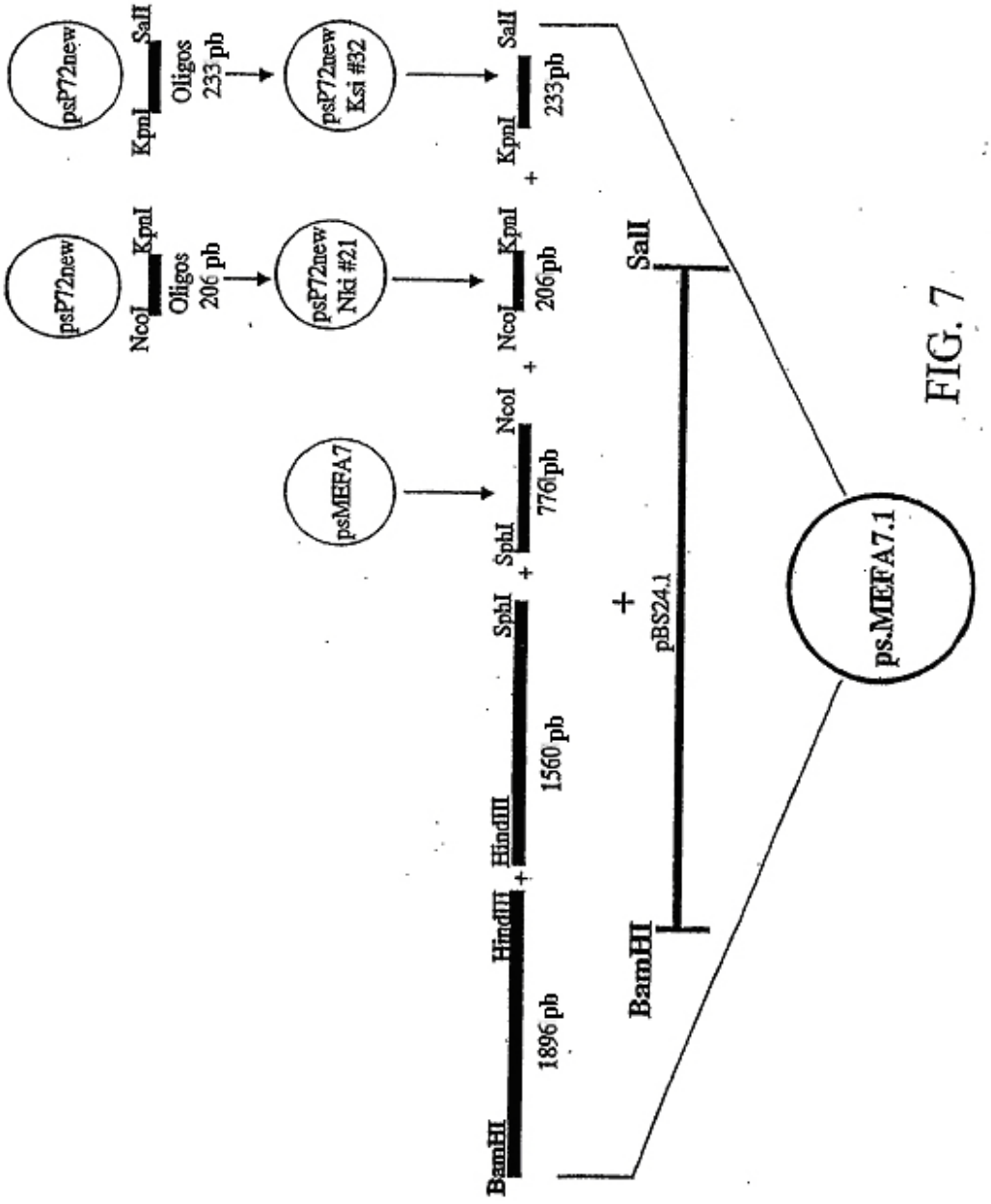

psP72new
KpnI
SalI
Oligos
233 pb
psP72new
Ksi #32
SalI
KpnI
233pb
psP72new
NcoI
KpnI
Oligos
206 pb
psP72new
Nki #21
NcoI
KpnI
206pb
psMEFA7
NcoI
SphI
776pb
SphI
HindIII
1560 pb
HindIII
BamHI
1896 pb
SalI
pBS24.1
BamHI
ps.MEFA7.1

FIG. 7

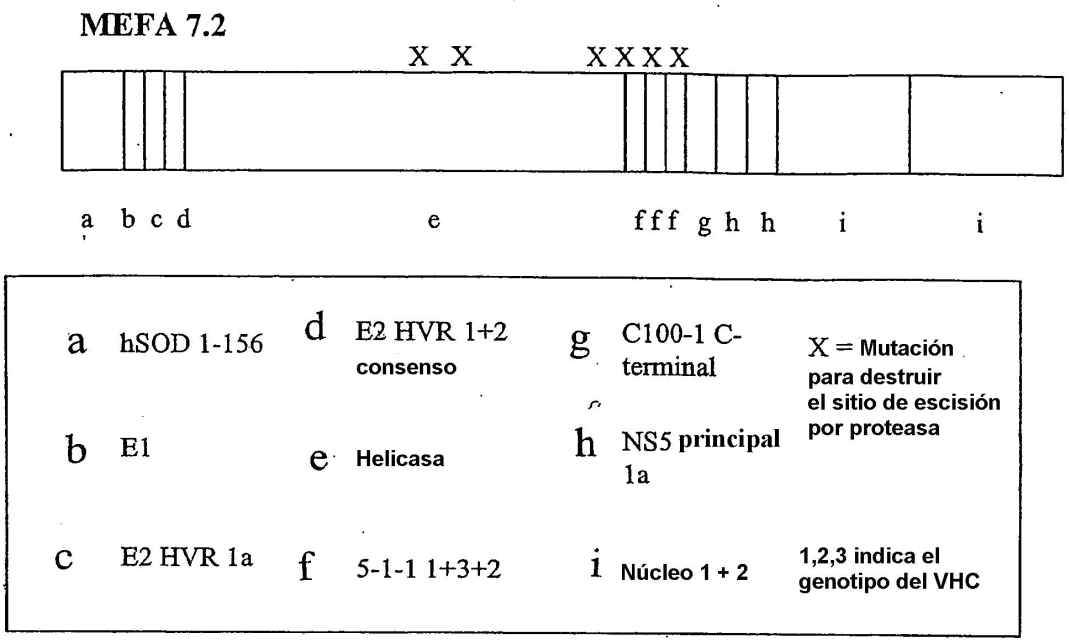

MEFA 7.2
X X
X X X X
a b c d
e
f f f g h h
i
i
a hSOD 1-156
b E1
c E2 HVR 1a
d E2 HVR 1+2 consenso
e Helicasa
f 5-1-1 1+3+2
g C100-1 C-terminal
h NS5 principal 1a
i Núcleo 1 + 2
X = Mutación para destruir el sitio de escisión por proteasa
1,2,3 indica el genotipo del VHC

Fig. 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 9A

```
                  200                                           210
 A   K   Q   N   E   T   H   V   T   G   G   A   A   A   R
GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA GCC GCC CGA

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

                  230                                           240
 N   I   Q   L   I   V   D   F   I   P   V   E   N   L   E
AAC ATT CAA TTG ATT GTC GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC CTA GAG

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

                  260                                           270
 V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A   P   T
GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA

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

                  290                                           300
 G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A   T   L
GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA ACA CTG

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

                  320                                           330
 I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P   I   T
ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC ATC ACG

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

                  350                                           360
 G   A   Y   D   I   I   I   C   D   E   C   H   S   T   D
GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG GAT

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

                  380                                           390
 T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T   P   P
ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC CCT CCG
```

FIG. 9B

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

                410                                     420
 S   T   T   G   E   I   P   F   Y   G   K   A   I   P   L
TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC CCC CTC

                                                430
 E   V   I   K   G   G   R   H   L   I   F   C   H   S   K
GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG

                440                                     450
 K   K   C   D   E   L   A   A   K   L   V   A   L   G   I
AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG GGC ATC

                                                460
 N   A   V   A   Y   Y   R   G   L   D   V   S   V   I   P
AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG

                470                                     480
 L   P   G   D   V   V   V   V   A   T   D   A   L   M   T
CTG CCC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC ATG ACC

                                                490
 G   Y   T   G   D   F   D   S   V   I   D   C   L   P   C
GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC CTG CCC TGT

                500                                     510
 V   T   Q   T   V   D   F   S   L   D   P   T   F   T   I
GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT

                                                520
 E   T   I   T   L   P   Q   D   A   V   S   R   T   Q   R
GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT

                530                                     540
 R   G   R   T   G   R   G   K   P   G   I   Y   R   F   V
CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA TTT GTG

                                                550
 A   P   G   E   R   P   S   G   M   F   D   S   S   V   L
GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC

                560                                     570
 C   E   C   Y   D   A   G   C   A   W   Y   E   L   T   P
TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC

                                                580
 A   E   T   T   V   R   L   R   A   Y   M   N   T   P   G
GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG
```

FIG. 9C

```
                  590                                                 600
 L   P   V   C   Q   D   H   L   E   F   W   E   G   V   F
CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC GTC TTT

                                      610
 T   G   L   T   H   I   D   A   H   F   L   S   Q   T   K
ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG

                  620                                                 630
 Q   S   G   E   N   L   P   Y   L   V   A   Y   Q   A   T
CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC

                                      640
 V   C   A   R   A   Q   A   P   P   P   S   W   D   Q   M
GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC CAG ATG

                  650                                                 660
 W   K   C   L   I   R   L   K   P   T   L   H   G   P   T
TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG CCA ACA

                                      670
 P   L   L   Y   R   L   G   A   V   Q   N   E   I   T   L
CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG

                  680                                                 690
 T   H   P   V   T   K   Y   I   M   T   C   M   S   A   D
ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG GCC GAC

                                      700
 L   E   V   V   L   P   A   C   S   G   K   P   A   I   I
CTG GAG GTC GTC CTG CCC GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA

                  710                                                 720
 P   D   R   E   V   L   Y   R   E   F   D   E   M   E   E
CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG

                                      730
 P   I   Q   H   L   P   Y   I   E   Q   G   M   M   L   A
CCC ATT CAG CAC TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC

                  740                                                 750
 E   Q   F   K   Q   K   A   L   G   L   S   R   G   G   K
GAG CAG TTC AAG CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG

                                      760
 P   A   I   V   P   D   K   E   V   L   Y   Q   Q   Y   D
CCG GCA ATC GTT CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT

                  770                                                 780
 E   M   E   E   P   I   Q   A   A   P   Y   I   E   Q   A
GAG ATG GAA GAG CCT ATA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT
```

FIG. 9D

```
                                                790
 Q   V   I   A   H   Q   F   K   E   K   V   L   G   L   I
CAG GTA ATA GCT CAC CAG TTC AAG GAA AAA GTC CTT GGA TTG ATC

                    800                             810
 D   N   D   Q   V   V   V   T   P   D   K   E   I   L   Y
GAT AAT GAT CAA GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT

                                                820
 E   A   F   D   E   M   E   E   P   I   S   K   A   A   L
GAG GCC TTT GAT GAG ATG GAA GAA CCA ATC TCC AAA GCC GCC CTC

                    830                             840
 I   E   E   G   Q   R   M   A   E   M   L   K   S   K   I
ATT GAG GAA GGG CAG CGG ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA

                                                850
 Q   G   L   L   G   I   L   R   R   H   V   G   P   G   E
CAA GGC CTC CTC GGG ATA CTG CGC CGG CAC GTT GGT CCT GGC GAG

                    860                             870
 G   A   V   Q   W   M   N   R   L   I   A   F   A   S   R
GGG GCA GTG CAG TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCC TTC GCC TCC AGA

                                                880
 G   N   H   V   S   P   T   H   Y   V   P   S   R   S   R
GGG AAC CAT GTT TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CGG

                    890                             900
 R   F   A   Q   A   L   P   V   W   A   R   P   D   Y   N
AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC

                                                910
 P   P   L   V   E   T   W   K   K   P   D   Y   E   P   P
CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT

                    920                             930
 V   V   H   G   R   S   S   R   R   F   A   Q   A   L   P
GTG GTC CAC GGC AGA TCT TCT CGG AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC

                                                940
 V   W   A   R   P   D   Y   N   P   P   L   V   E   T   W
GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG

                    950                             960
 K   K   P   D   Y   E   P   P   V   V   H   G   R   K   T
AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC

                                                970
 K   R   N   T   N   R   R   P   Q   D   V   K   F   P   G
AAA CGT AAC ACC AAC CGG CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT
```

FIG. 9E

```
                  980                                                990
 G   G   Q   I   V   G   R   R   G   P   P   I   P   K   A
GGC GGT CAG ATC GTT GGT CGC AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT

                                     1000
 R   R   P   E   G   R   T   W   A   Q   P   G   Y   P   W
CGT CGG CCC GAG GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG

                  1010                                             1020
 P   L   Y   G   N   K   D   R   R   S   T   G   K   S   W
CCC CTC TAT GGC AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG

                                     1030
 G   K   P   G   Y   P   W   P   R   K   T   K   R   N   T
GGT AAG CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC

                  1040                                             1050
 N   R   R   P   Q   D   V   K   F   P   G   G   G   Q   I
AAC CGA CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC

                                     1060
 V   G   R   R   G   P   P   I   P   K   A   R   R   P   E
GTT GGT CGC AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG CCC GAG

                  1070                                             1080
 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

                                     1090
 N   K   D   R   R   S   T   G   K   S   W   G   K   P   G
AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACC GGT AAG TCC TGG GGT AAG CCA GGG

              1099
 Y   P   W   P
TAT CCT TGG CCC
```

FIG. 9F

```
           1                                                          50
mefa7.1aa  MATKAVCVLK GDGPVQGIIN FEQKESNGPV KVWGSIKGLT EGLHGFHVHE
mefa7.2aa  MATKAVCVLK GDGPVQGIIN FEQKESNGPV KVWGSIKGLT EGLHGFHVHE

           51                                                         100
mefa7.1aa  FGDNTAGCTS AGPHFNPLSR KHGGPKDEER HVGDLGNVTA DKDGVADVSI
mefa7.2aa  FGDNTAGCTS AGPHFNPLSR KHGGPKDEER HVGDLGNVTA DKDGVADVSI

           101                                                        150
mefa7.1aa  EDSVISLSGD HCIIGRTLVV HEKADDLGKG GNEESTKTGN AGSRLACGVI
mefa7.2aa  EDSVISLSGD HCIIGRTLVV HEKADDLGKG GNEESTKTGN AGSRLACGVI

           151                                                        200
mefa7.1aa  GIAQNLNSGC NCSIYPGHIT GHRMAWKLGS AARTTSGFVS LFAPGAKQNE
mefa7.2aa  GIAQNLNSGC NCSIYPGHIT GHRMAWKLGS AARTTSGFVS LFAPGAKQNE

           201                                                        250
mefa7.1aa  THVTGGAAAR TTSGLTSLFS PGASQNIQLI VDFIPVENLE TTMRSPVFTD
mefa7.2aa  THVTGGAAAR TTSGLTSLFS PGASQNIQLI VDFIPVENLE TTMRSPVFTD

           251                                                        300
mefa7.1aa  NSSPPVVPQS FQVAHLHAPT GSGKSTKVPA AYAAQGYKVL VLNPSVAATL
mefa7.2aa  NSSPPVVPQS FQVAHLHAPT GSGKSTKVPA AYAAQGYKVL VLNPSVAATL

           301                                                        350
mefa7.1aa  GFGAYMSKAH GIDPNIRTGV RTITTGSPIT YSTYGKFLAD GGCSGGAYDI
mefa7.2aa  GFGAYMSKAH GIDPNIRTGV RTITTGSPIT YSTYGKFLAD GGCSGGAYDI

           351                                                        400
mefa7.1aa  IICDECHSTD ATSILGIGTV LDQAETAGAR LVVLATATPP GSVTVPHPNI
mefa7.2aa  IICDECHSTD ATSILGIGTV LDQAETAGAR LVVLATATPP GSVTVPHPNI

           401                                                        450
mefa7.1aa  EEVALSTTGE IPFYGKAIPL EVIKGGRHLI FCHSKKKCDE LAAKLVALGI
mefa7.2aa  EEVALSTTGE IPFYGKAIPL EVIKGGRHLI FCHSKKKCDE LAAKLVALGI

           451                                                        500
mefa7.1aa  NAVAYYRGLD VSVIPTSGDV VVVATDALMT GYTGDFDSVI DCNTCVTQTV
mefa7.2aa  NAVAYYRGLD VSVIPLPGDV VVVATDALMT GYTGDFDSVI DCLPCVTQTV

           501                                                        550
mefa7.1aa  DFSLDPTFTI ETITLPQDAV SRTQRRGRTG RGKPGIYRFV APGERPSGMF
mefa7.2aa  DFSLDPTFTI ETITLPQDAV SRTQRRGRTG RGKPGIYRFV APGERPSGMF

           551                                                        600
mefa7.1aa  DSSVLCECYD AGCAWYELTP AETTVRLRAY MNTPGLPVCQ DHLEFWEGVF
mefa7.2aa  DSSVLCECYD AGCAWYELTP AETTVRLRAY MNTPGLPVCQ DHLEFWEGVF

           601                                                        650
mefa7.1aa  TGLTHIDAHF LSQTKQSGEN LPYLVAYQAT VCARAQAPPP SWDQMWKCLI
mefa7.2aa  TGLTHIDAHF LSQTKQSGEN LPYLVAYQAT VCARAQAPPP SWDQMWKCLI
```

FIG. 10A

```
           651                                                        700
mefa7.1aa  RLKPTLHGPT PLLYRLGAVQ NEITLTHPVT KYIMTCMSAD LEVVTSACSG
mefa7.2aa  RLKPTLHGPT PLLYRLGAVQ NEITLTHPVT KYIMTCMSAD LEVVLPACSG

           701                                                        750
mefa7.1aa  KPAIIPDREV LYREFDEMEE CSQHLPYIEQ GMMLAEQFKQ KALGLSRGGK
mefa7.2aa  KPAIIPDREV LYREFDEMEE PIQHLPYIEQ GMMLAEQFKQ KALGLSRGGK

           751                                                        800
mefa7.1aa  PAIVPDKEVL YQQYDEMEEC SQAAPYIEQA QVIAHQFKEK VLGLIDNDQV
mefa7.2aa  PAIVPDKEVL YQQYDEMEEP IQAAPYIEQA QVIAHQFKEK VLGLIDNDQV

           801                                                        850
mefa7.1aa  VVTPDKEILY EAFDEMEECA SKAALIEEGQ RMAEMLKSKI QGLLGILRRH
mefa7.2aa  VVTPDKEILY EAFDEMEEPI SKAALIEEGQ RMAEMLKSKI QGLLGILRRH

           851                                                        900
mefa7.1aa  VGPGEGAVQW MNRLIAFASR GNHVSPTHYV PSRSRRFAQA LPVWARPDYN
mefa7.2aa  VGPGEGAVQW MNRLIAFASR GNHVSPTHYV PSRSRRFAQA LPVWARPDYN

           901                                                        950
mefa7.1aa  PPLVETWKKP DYEPPVVHGR SSRRFAQALP VWARPDYNPP LVETWKKPDY
mefa7.2aa  PPLVETWKKP DYEPPVVHGR SSRRFAQALP VWARPDYNPP LVETWKKPDY

           951                                                       1000
mefa7.1aa  EPPVVHGRKT KRNTNRRPQD VKFPGGGQIV GRRGPPIPKA RRPEGRTWAQ
mefa7.2aa  EPPVVHGRKT KRNTNRRPQD VKFPGGGQIV GRRGPPIPKA RRPEGRTWAQ

           1001                                                      1050
mefa7.1aa  PGYPWPLYGN KDRRSTGKSW GKPGYPWPRK TKRNTNRRPQ DVKFPGGGQI
mefa7.2aa  PGYPWPLYGN KDRRSTGKSW GKPGYPWPRK TKRNTNRRPQ DVKFPGGGQI

           1051                                                      1100
mefa7.1aa  VGRRGPPIPK ARRPEGRTWA QPGYPWPLYG NKDRRSTGKS WGKPGYPWP.
mefa7.2aa  VGRRGPPIPK ARRPEGRTWA QPGYPWPLYG NKDRRSTGKS WGKPGYPWP.
```

FIG. 10B

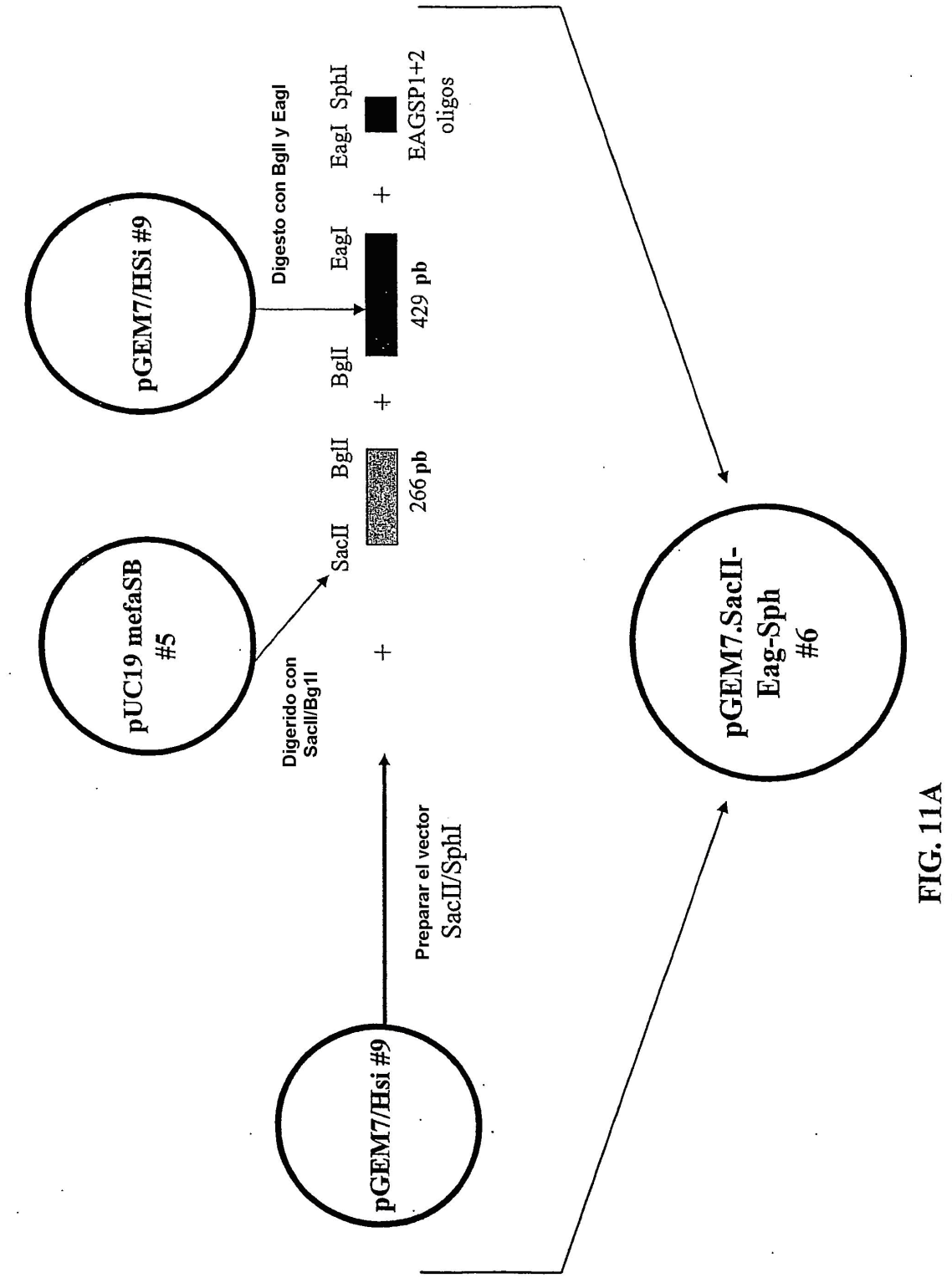

pGEM7/HSi #9
Digesto con BglI y EagI
EagI SphI
EagI
BglI
+
+
EAGSP1+2 oligos
429 pb
SacII BglI
266 pb
pUC19 mefaSB #5
Digerido con SacII/Bg1I
+
pGEM7/Hsi #9
Preparar el vector SacII/SphI
pGEM7.SacII-Eag-Sph #6

FIG. 11A

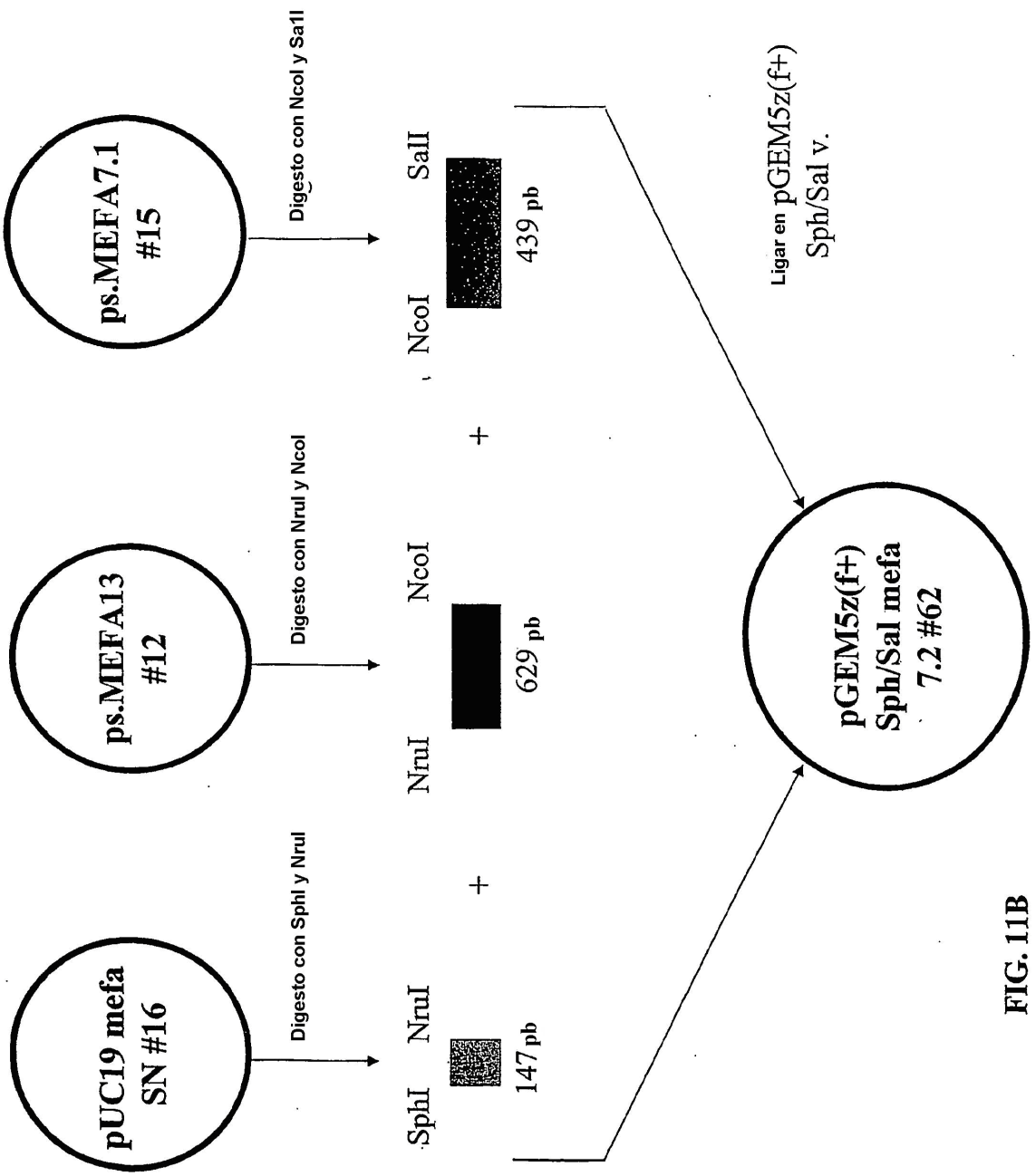

pUC19 mefa SN #16
Digesto con SphI y NruI
SphI NruI
147 pb
+
ps.MEFA13 #12
Digesto con NruI y NcoI
NruI NcoI
629 pb
+
ps.MEFA7.1 #15
Digesto con NcoI y SalI
NcoI SalI
439 pb
Ligar en pGEM5z(f+) Sph/Sal v.
pGEM5z(f+) Sph/Sal mefa 7.2 #62

FIG. 11B

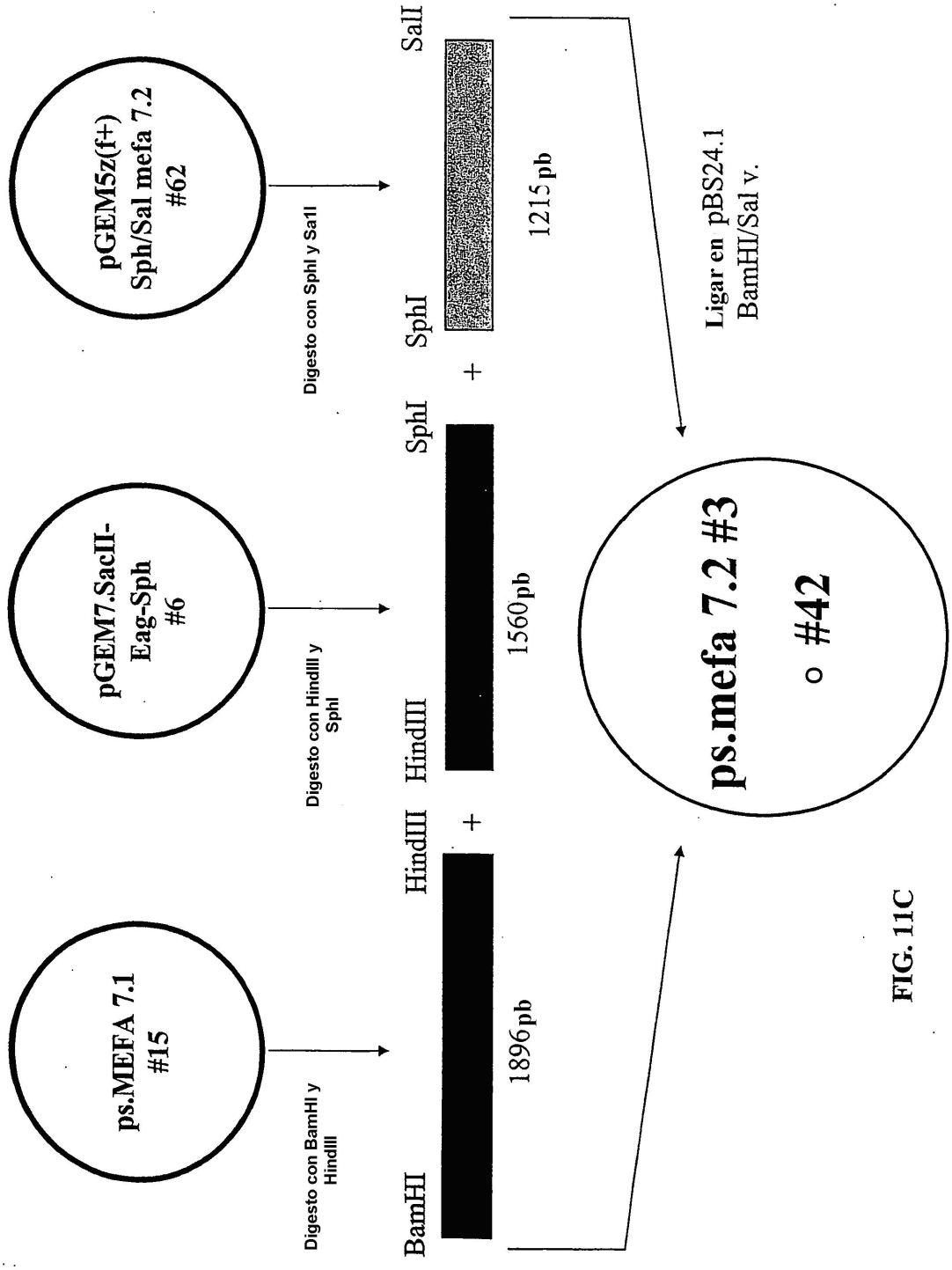

pGEM5z(f+)
Sph/Sal mefa 7.2
#62
Digesto con SphI y SalI
SphI
SalI
1215 pb
pGEM7.SacII-
Eag-Sph
#6
Digesto con HindIII y
SphI
SphI
HindIII
1560pb
ps.MEFA 7.1
#15
Digesto con BamHI y
HindIII
BamHI
HindIII
1896pb
+
+
Ligar en pBS24.1
BamHI/Sal v.
ps.mefa 7.2 #3
o #42

FIG. 11C

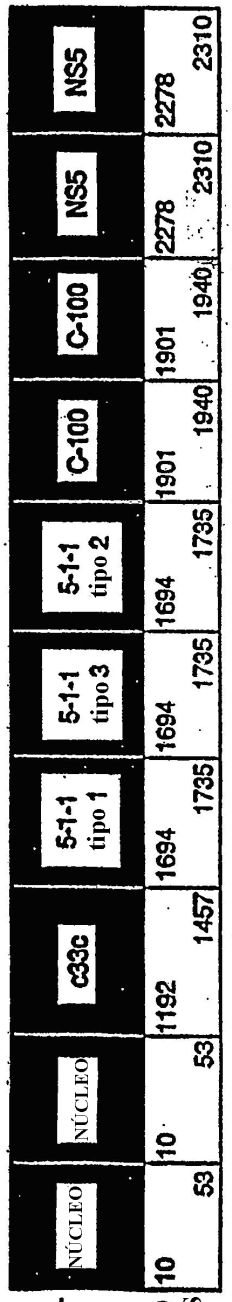


FIG. 12A

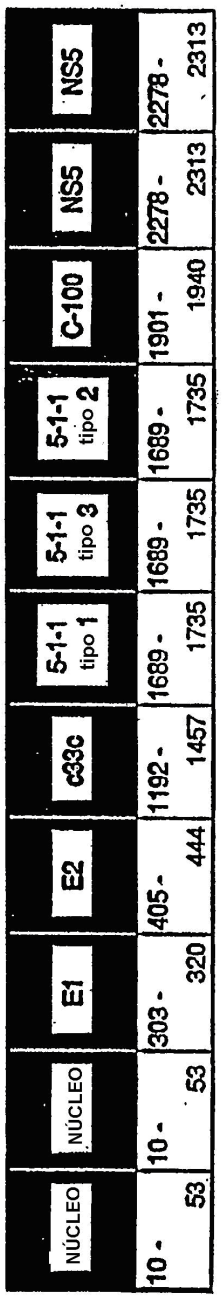


FIG. 12B

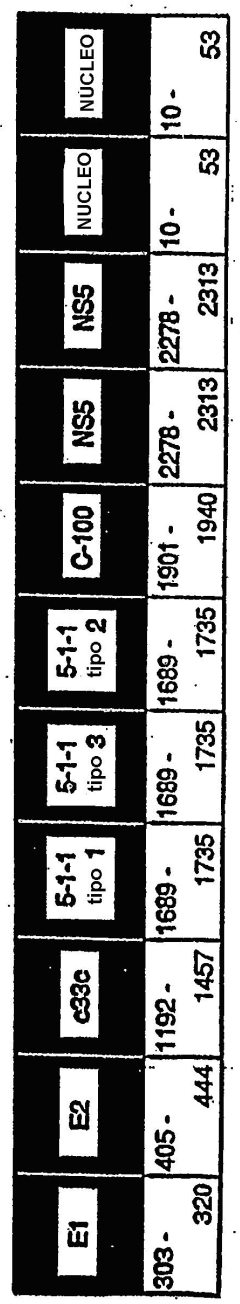


FIG. 12C

```
                    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. 13A

```
                                                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. 13B

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 13C

```
                                                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. 13D

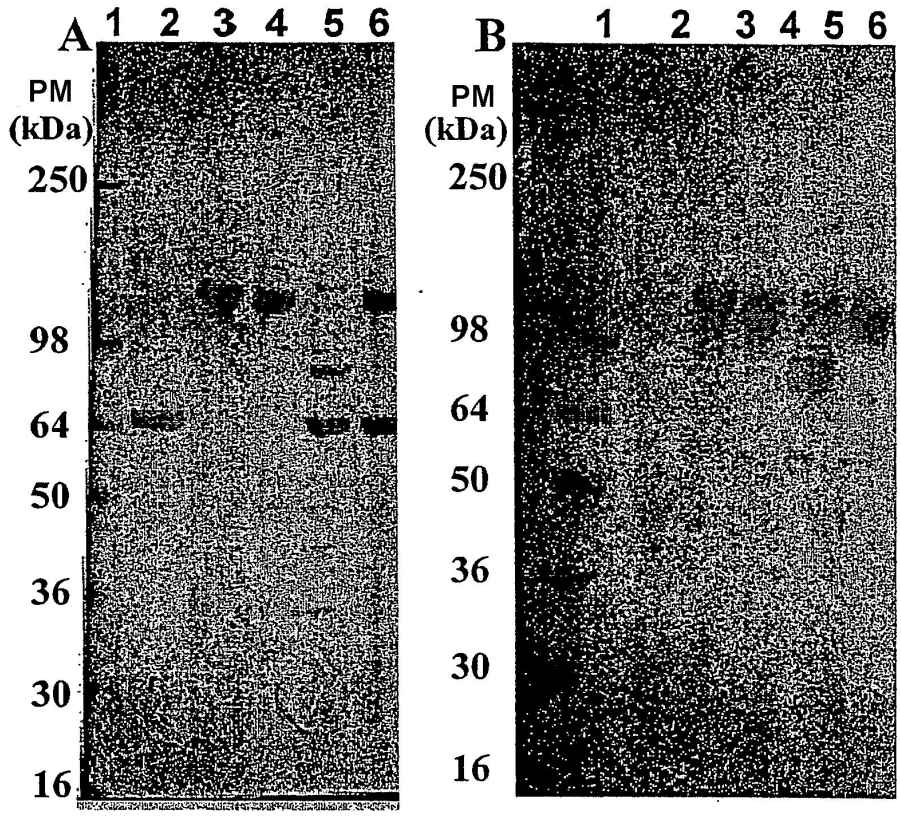

A
1 2 3 4 5 6
PM
(kDa)
250
98
64
50
36
30
16
B
1 2 3 4 5 6
PM
(kDa)
250
98
64
50
36
30
16

Fig. 14