

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 631**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/576** (2006.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2002 E 02746647 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 1412538**

54 Título: **Métodos para la detección simultánea de antígenos del VHC y anticuerpos para el VHC**

30 Prioridad:

**26.06.2001 US 891983**

**17.06.2002 US 173480**

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

**27.06.2013**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)  
Dept. 377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road  
Abbott Park, IL 60064-6050, US**

72 Inventor/es:

**SHAH, DINESH O.;  
DAWSON, GEORGE A.;  
MUERHOFF, A. SCOTT;  
JIANG, LILY;  
GUTIERREZ, ROBIN A.;  
LEARY, THOMAS P.;  
DESAI, SURESH y  
STEWART, JAMES L.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 409 631 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para la detección simultánea de antígenos del VHC y anticuerpos para el VHC

5 **Antecedentes de la invención****Campo técnico**

10 La presente invención se relaciona con métodos para la detección simultánea de antígenos del Virus de la Hepatitis C (VHC), así como de anticuerpos producidos en respuesta a los antígenos del VHC. Más aún, la presente invención permite detectar antígenos en el estadio agudo precoz de la infección, incluso antes del desarrollo de anticuerpos, permitiendo de este modo la detección precoz de sangre y productos sanguíneos infectados y mejorando de este modo la seguridad del suministro de sangre.

15 **Información sobre antecedentes**

Recientes estudios epidemiológicos indican que el VHC infecta a más de 170 millones de personas en todo el mundo y que, en más del 50% de los casos, la infección es crónica. En los Estados Unidos, existen aproximadamente 4 millones de personas infectadas y se estima que anualmente se producen 30.000 nuevas infecciones (NIH Conference, Hepatology Suppl. 1:2S (1997)). Además, el VHC es responsable de 8.000-10.000 muertes anuales en los Estados Unidos y es el indicador principal para el trasplante de hígado.

25 El genoma del VHC es una molécula de ARN de una sola hebra de polaridad positiva, que tiene una longitud de aproximadamente 9.400-9.500 nucleótidos. La organización de las regiones codificantes se asemeja a la de otros flavivirus [Major *et al.*, Hepatology 25: 1527 (1997)], así como a la de los virus GB más recientemente descubiertos [Muerhoff AS, *et al.*, J. Virol. 69: 5621 (1995)]. El genoma del VHC posee un gran marco abierto de lectura (ORF) codificante de un precursor de poliproteína de 3.010 a 3.033 aminoácidos dependiendo del aislado particular [Choo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2451 (1991); Grakoui *et al.*, J. Virol. 67: 1385 (1993)]. Los genes estructurales del VHC (núcleo y envuelta) son codificados cerca del extremo 5' del genoma, seguidos de las proteasas y la helicasa, el cofactor de la helicasa y la replicasa. Se encuentran en cada lado del genoma regiones no codificantes (RNC), que se piensa son importantes en la replicación.

35 La infección por el VHC se produce primariamente por exposición parenteral, es decir, a través de agujas compartidas, tatuajes o transfusión de sangre o productos sanguíneos contaminados. Tras la exposición, el virus entra en un hepatocito susceptible y se produce la replicación vírica. Existe un período de fase de eclipse de aproximadamente 10 días, durante el cual no hay evidencia de presencia vírica (es decir, no se puede detectar ARN vírico), los niveles séricos de transaminasas están dentro de límites normales y no hay evidencia de respuesta inmune al VHC [Busch *et al.*, Transfusion 40: 143 (2000)]. Típicamente, aproximadamente 10 días después de la exposición se puede detectar el ARN del VHC, frecuentemente con cargas víricas de entre 100.000 y 120.000.000 copias de ARN del VHC por ml de suero. Varias semanas después, típicamente se produce un incremento en los niveles de ALT, lo que indica inflamación del hígado; se detectan anticuerpos aproximadamente 70 días tras la exposición como media.

45 Una de las medidas preventivas empleadas para limitar la propagación de las infecciones por VHC es rastrear la sangre en cuanto a exposición al VHC, ya sea por detección de anticuerpos para el VHC o por detección de moléculas específicas del virus (*v.g.*, ARN del VHC o proteínas del núcleo del VHC) en suero/plasma. Se retiran la sangre o los productos sanguíneos derivados de individuos identificados como expuestos al VHC por medio de estas pruebas del suministro de sangre y no se utilizan para distribución a receptores de productos sanguíneos (*véase*, *v.g.*, la Patente EE.UU. Nº 6.172.189). Estas pruebas pueden ser también utilizadas en el marco clínico para diagnosticar una enfermedad hepática atribuible a infección por VHC.

50 Debido a la falta de disponibilidad de viriones de VHC intactos nativos, las pruebas serológicas de anticuerpos se han basado en antígenos recombinantes o péptidos sintéticos, que representan fragmentos seleccionados de la poliproteína vírica. Las pruebas de rastreo anti-VHC de primera generación se basaban en la detección de anticuerpos dirigidos contra una proteína recombinante (genotipo del VHC 1a) originada a partir de secuencias localizadas en la proteína no estructural NS-4 (C100-3) [Choo *et al.*, Science 244: 359 (1989); Kuo *et al.*, Science 244: 362 (1989)]. Los ensayos de primera generación no podían detectar anticuerpos en aproximadamente un 10% de individuos con infección crónica por VHC y en hasta un 10-30% de individuos con infección aguda por VHC. Los ensayos anti-VHC de segunda generación han incorporado proteínas recombinantes de tres regiones diferentes del genoma del VHC (genotipo del VHC 1a), que incluyen secuencias de aminoácidos del núcleo, NS3 y la proteína NS4 [Mimms *et al.*, Lancet 336: 1590 (1990) ; Bresters *et al.*, Vox Sang 62: 213 (1992)], lo que permite un marcado perfeccionamiento con respecto a las pruebas de primera generación en la identificación de donantes de sangre infectados por VHC [Aach *et al.*, N. Engl. J. Med. 325: 1325 (1991); Kleinman *et al.*, Transfusion 32: 805 (1992)]. Los ensayos de segunda generación detectan anticuerpos en prácticamente un 100% de los casos crónicos de VHC [Hino K., Intervirology 37: 77 (1994)] y en casi un 100% de los casos agudos hacia las 12 semanas posteriores a la infección [Alter *et al.*, N. Engl. J. Med. 327: 1899 (1992); Bresters *et al.*, Vox Sang 62: 213 (1992)]. La prueba de

tercera generación incluye una proteína recombinante que expresa secuencias de aminoácidos de la región NS5, así como antígenos del núcleo, NS3 y NS4. Algunos estudios han indicado un ligero perfeccionamiento en cuanto a sensibilidad al comparar las pruebas de tercera generación con las pruebas de segunda generación [Lee *et al.*, *Transfusion* 35: 845 (1995); Courouce *et al.* *Transfusion* 34: 790-795 (1994)], pero este perfeccionamiento es atribuido en gran medida a cambios en la proteína NS3, más que a la inclusión de NS5 [Courouce *et al.*, *Lancet* 343: 853 (1994)].

En general, las pruebas de anticuerpos para el VHC de segunda y tercera generación detectan la exposición al VHC aproximadamente 70 días después de la exposición. Como el VHC establece una infección persistente, y en muchos casos de por vida, la detección de anticuerpos para el VHC representa un método muy eficiente para determinar la exposición al VHC. Sin embargo, las pruebas de anticuerpos por sí solas frecuentemente fallarán en la detección de individuos infectados por el VHC durante los primeros 70 días tras la exposición.

Las pruebas existentes para el antígeno del VHC se basan en la detección de la presencia del antígeno del núcleo del VHC en suero o plasma. La proteína del núcleo (o nucleocápside) comprende los primeros 191 aminoácidos de la poliproteína. Se han desarrollado dos tipos diferentes de ensayos serológicos que permiten la detección de antígenos del núcleo del VHC en suero. Un formato de ensayo detecta antígenos del núcleo del VHC en sujetos antes de la seroconversión y se utiliza en el rastreo de donantes de sangre, mientras que el otro formato de ensayo detecta antígenos del núcleo sólo en pacientes con hepatitis C, independientemente de su estado de anticuerpos para el VHC, y se utiliza en laboratorios clínicos para diagnosticar la exposición al VHC o para monitorizar la terapia antivírica.

Datos recientes sobre muestras obtenidas durante el período de preseroconversión indican que la prueba de antígenos del VHC detecta la exposición al VHC significativamente antes que las pruebas de anticuerpos [Aoyagi *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 37: 1802 (1999); Peterson *et al.*, *Vox Sang* 78: 80 (2000); Dawson *et al.*, *Transfusion*, SD161, 40 (2000); Muerhoff *et al.*, 7th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses, 3-7 de Diciembre de 2000] y representa una alternativa a las pruebas de ácidos nucleicos para detectar la exposición al VHC durante el período de preseroconversión. Las ventajas de la detección de antígenos del VHC son que la prueba es rápida y simple, que puede no requerir extracción de muestras u otro pretratamiento y que no es tan propensa a errores de manipulación (*v.g.*, contaminación) como lo que puede ocurrir en las pruebas del ARN del VHC.

En los laboratorios clínicos, la prueba de antígenos del VHC tiene una sensibilidad comparable a la de las pruebas del ADN del VHC en la detección de la exposición al VHC en pacientes infectados con diferentes genotipos de VHC [Dickson *et al.*, *Transplantation* 68: 1512 (1999)] y en la monitorización de la terapia antivírica [Tanaka *et al.*, *Hepatology* 32: 388 (2000); Tanaka *et al.*, *J. Hepatol.* 23: 742 (1995)]. Así, las pruebas de antígenos del núcleo del VHC presentan una alternativa práctica al ARN del VHC para el rastreo de donantes de sangre o para monitorizar la terapia antivírica.

La singularidad de la presente invención reside en su capacidad para detectar anticuerpos para el VHC y antígenos del VHC simultáneamente (véase también la Solicitud Internacional N° WO 00/07023). Esta prueba de combinación o ensayo "combo" utiliza la detección de antígenos para identificar la exposición al VHC durante el "período de ventana" de la preseroconversión y la detección de anticuerpos para identificar la exposición al VHC tras la seroconversión.

#### Resumen de la invención

La presente invención incluye un método para detectar simultáneamente la presencia de al menos un antígeno del núcleo del VHC y al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC en una muestra de ensayo, consistente en las siguientes etapas:

(a) poner en contacto dicha muestra de ensayo con:

(1) al menos un antígeno del núcleo viral del VHC depositado sobre una fase sólida durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno, donde dicho antígeno del núcleo viral del VHC es una proteína recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos consistente en la SEC. ID. N° 6 y sustituciones conservadoras de aminoácidos de la misma, y

(2) al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC depositado sobre dicha fase sólida durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno/anticuerpo, donde dicho al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC depositado sobre dicha fase sólida es C11-14;

(b) añadir un conjugado a los complejos anticuerpo/antígeno resultantes de (a) (1) durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para permitir que dicho conjugado se una al anticuerpo unido de (a) (1), donde dicho conjugado incluye un segundo anticuerpo unido a un compuesto quimioluminiscente capaz de generar una señal detectable, y añadir simultáneamente un segundo conjugado a los complejos antígeno/anticuerpo resultantes de (a) (2) durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para permitir que dicho

conjugado se una al antígeno del núcleo unido de (a) (2), donde dicho segundo conjugado incluye un tercer anticuerpo unido a dicho compuesto quimioluminiscente capaz de generar una señal detectable, donde dicho tercer anticuerpo es C11-10; y

5 (c) detectar dicha señal generada, indicando la presencia de dicha señal la presencia de dicho al menos un antígeno del núcleo del VHC, de dicho al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC o de ambos en dicha muestra de ensayo.

10 En una realización, dicho al menos un anticuerpo antinúcleo monoclonal depositado sobre la fase sólida no reacciona con dicho al menos un antígeno del núcleo depositado sobre la fase sólida.

15 En otra realización, dicha fase sólida es una micropartícula. La presente invención incluye además un kit consistente en: a) un recipiente que contiene al menos un antígeno del núcleo del VHC depositado sobre una fase sólida, donde dicho antígeno del núcleo vírico del VHC es una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en la SEC. ID. N° 6 y sustituciones conservadoras de aminoácidos de la misma, y b) un recipiente que contiene al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC depositado sobre una fase sólida, donde dicho al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC depositado sobre dicha fase sólida es C11-14, y donde dicho kit incluye además al menos un conjugado consistente en un compuesto generador de señal unido a un segundo anticuerpo, donde dicho segundo anticuerpo es C11-10. En una realización, dicho compuesto generador de señal es acridinio.

20 También se describen aquí métodos, donde el al menos un antígeno del VHC depositado sobre la fase sólida puede ser seleccionado entre el grupo consistente en antígeno del núcleo, NS3, NS4, NS5 y porciones de los mismos. Además, el al menos un anticuerpo depositado sobre la fase sólida puede ser un anticuerpo monoclonal seleccionado entre el grupo consistente en, por ejemplo, 13-959-270, 14-1269-281, 14-1287-252, 14-153-234, 14-153-462, 14-1705-225, 14-1708-269, 14-1708-403, 14-178-125, 14-188-104, 14-283-112, 14-635-225, 14-726-217, 14-886-216, 14-947-104, 14-945-218, 13-975-157, 14-1350-210, 107-35-54, 110-81-17, C11-3, C11-7, C11-10, C11-14 y C11-15. El al menos un anticuerpo monoclonal depositado sobre la fase sólida es preferiblemente no reactivo con el al menos un antígeno depositado sobre la fase sólida.

30 Además, la presente invención incluye un kit que consiste en: un recipiente que contiene: 1) al menos un antígeno del núcleo del VHC depositado sobre una fase sólida, donde dicho antígeno del núcleo vírico del VHC es una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en la SEC. ID. N° 6 y sustituciones conservadoras de aminoácidos de la misma, y 2) al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC depositado sobre dicha fase sólida, donde dicho al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC depositado sobre dicha fase sólida es C11-14, y donde dicho kit incluye además al menos un conjugado constituido por un compuesto generador de señal unido a un segundo anticuerpo, donde dicho segundo anticuerpo es C11-10.

40 El compuesto generador de señal puede ser, por ejemplo, acridinio o un compuesto que contenga acridinio.

45 También se describe aquí un método de detección de antígeno VHC en una muestra de ensayo que comprende las siguientes etapas: a) contacto de la muestra de ensayo con al menos un anticuerpo para el VHC (*v.g.*, monoclonal) depositado sobre una fase sólida, donde la fase sólida es una micropartícula, durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno, y b) detección de la presencia de complejos anticuerpo/antígeno, indicando la presencia de los complejos la presencia de antígeno en la muestra de ensayo.

50 También se describe aquí un método de detección de antígeno VHC en una muestra de ensayo que comprende las siguientes etapas: a) contacto de la muestra de ensayo con al menos un anticuerpo para el VHC (*v.g.*, monoclonal) depositado sobre una fase sólida, donde la fase sólida es preferiblemente una micropartícula, durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno; b) adición de un conjugado a los complejos anticuerpo/antígeno resultantes durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al al menos un anticuerpo unido, donde el conjugado incluye un segundo anticuerpo unido a un marcaje, por ejemplo un compuesto quimioluminiscente, capaz de generar una señal detectable, y c) detección de la señal generada por el marcaje, por ejemplo un compuesto quimioluminiscente, indicando una señal generada por el marcaje la presencia de antígeno en la muestra de ensayo.

60 Además, la presente invención incluye una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en la SEC. ID. N° 6, así como una secuencia de aminoácidos que comprende sustituciones conservadoras de aminoácidos de esta secuencia. (Una sustitución conservadora se define como una o más sustituciones de aminoácidos en una secuencia que no cambian la función de la secuencia). La presente invención también incluye una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos consistente en la SEC. ID. N° 5. (También se consideran dentro del alcance de la presente invención sustituciones, delecciones y adiciones dentro de las secuencias que no afecten funcionalmente a la proteína codificada por la secuencia).

65

Adicionalmente, la presente invención incluye un vector o construcción que comprende una secuencia nucleotídica consistente en la SEC. ID. N° 5. La invención también incluye una célula huésped que contiene el vector o la construcción.

5

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra el formato de ensayo de Ab para VHC PRISM® de Abbott. El ensayo utiliza un formato en 2 etapas que consiste en micropartículas revestidas con antígenos VHC recombinantes de las regiones del núcleo, NS3, NS4 y NS5 del genoma del VHC. Estas micropartículas, cuando se combinan con el espécimen del donante, un diluyente y un complejo de conjugado fragmento F(ab')<sub>2</sub> policlonal de cabra antihumano/antibiotina monoclonal murino:acridinio, dan una cantidad de fotones que representa una medición cualitativa de los anticuerpos anti-VHC en el espécimen cuando se activan con la solución Activadora PRISM®.

10

La Figura 2 ilustra el formato de ensayo de VHC. Este ensayo también utiliza un formato en 2 etapas. Cuando se combinan micropartículas revestidas con mAb VHC (v.g., c11-14) con el espécimen del donante, un diluyente y mAb marcado con acridinio (v.g., c11-10 marcado con acridinio), se producirá como resultado una cantidad de fotones que representa una medición cualitativa de los antígenos anti-VHC en el espécimen. La cantidad medida de fotones indica la cantidad de antígenos VHC en el espécimen cuando se activan con la solución Activadora PRISM®.

15

La Figura 3 ilustra el formato de ensayo combo de Ag/Ab VHC. El ensayo utiliza un formato en 2 etapas. Cuando se combinan micropartículas mezcladas de antígeno recombinante y anticuerpo monoclonal VHC (v.g., péptido VHC del núcleo y antígenos recombinantes de las regiones NS3, NS4 y NS5 del genoma del VHC mezclados con micropartículas revestidas con c11-14) con el espécimen del donante, un diluyente y mAb marcados con acridinio mezclados (v.g., c11-10 marcado con acridinio e IgG de ratón antihumana acridinilada), se producirá como resultado una cantidad de fotones que representa una medición cualitativa de antígenos anti-VHC o anticuerpos anti-VHC o ambos en el espécimen cuando se activan con la solución Activadora PRISM®.

20

25

La Figura 4 da una lista de todas las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos a las que se hace aquí referencia, así como de los correspondientes números identificadores de secuencias.

30

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con métodos para detectar simultáneamente antígenos de la proteína del núcleo del VHC y anticuerpos para la proteína del núcleo del VHC en una muestra biológica. Así, si un individuo ha desarrollado anticuerpos específicos para la proteína del núcleo del VHC y/o tiene antígenos específicos del núcleo del VHC en la muestra biológica estudiada, los métodos de la presente invención darán un resultado positivo. Dichos resultados pueden ser usados, por ejemplo, para diagnosticar al paciente en términos de la presencia y del estado de la infección (es decir, aguda o crónica), así como para determinar la adecuación de una muestra de sangre o de producto sanguíneo de un donante para transfusión.

35

40

Además, la presente invención resuelve los problemas asociados al "período de ventana" (es decir, 50-60 días postinfección), donde un individuo puede estar infectado con VHC pero puede no haber desarrollado aún anticuerpos. Dichos individuos pueden transmitir el VHC a otros durante este período. Así, detectando el VHC durante este "período de ventana", la presente invención permite un rápido diagnóstico del VHC, en contraposición a esperar al desarrollo de anticuerpos, y previene la contaminación del suministro de sangre.

45

En un aspecto de la presente descripción, se depositan antígenos víricos del VHC (v.g., núcleo, N3, N4 y N5), o porciones de los mismos, sobre una fase sólida (o están en una fase líquida). Se pone entonces en contacto la muestra de ensayo o biológica (v.g., suero, plasma, orina, etc.) con la fase sólida. Si hay presencia de anticuerpos en la muestra, dichos anticuerpos se unen a los antígenos sobre la fase sólida y se detectan luego por un método directo o indirecto. El método directo consiste simplemente en detectar la presencia del propio complejo y, por lo tanto, la presencia de los anticuerpos. En el método indirecto, se añade un conjugado al anticuerpo unido. El conjugado incluye un segundo anticuerpo, que se une al primer anticuerpo unido, unido a un compuesto generador de señal o marcaje. Si el segundo anticuerpo se une a un primer anticuerpo unido, el compuesto generador de señal genera una señal mensurable. Dicha señal indica entonces la presencia del primer anticuerpo en la muestra de ensayo.

50

55

Son ejemplos de fases sólidas usadas en inmunoensayos diagnósticos materiales porosos y no porosos, partículas de látex, partículas magnéticas, micropartículas (véase la Patente EE.UU. N° 5.705.330), perlas, membranas, pocillos de microtitulación y tubos de plástico. La elección del material de la fase sólida y el método de marcaje del antígeno o del anticuerpo presente en el conjugado, si se desea, son determinados en base a las características de rendimiento del formato de ensayo deseadas.

60

Como se ha indicado anteriormente, el conjugado (o reactivo indicador) incluirá un anticuerpo (o quizá antianticuerpo, dependiendo del ensayo), unido a un compuesto generador de señal o marcaje. Este compuesto

65

generador de señal o "marcaje" es detectable por sí mismo o puede reaccionar con uno o más compuestos adicionales para generar un producto detectable. Como ejemplos de compuestos generadores de señal, se incluyen cromógenos, radioisótopos (v.g.,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$  y  $^{14}\text{C}$ ), compuestos quimioluminiscentes (v.g., acridinio), partículas (visibles o fluorescentes), ácidos nucleicos, agentes acomplejantes o catalizadores, tales como enzimas (v.g., fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y ribonucleasa). En el caso del uso de enzimas (v.g., fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante), la adición de un sustrato cromogénico, fluorogénico o lumogénico da lugar a la generación de una señal detectable. Son también útiles otros sistemas de detección, tales como fluorescencia de resolución temporal, fluorescencia de reflexión interna, amplificación (v.g., reacción en cadena de polimerasa) y espectroscopia Raman.

Como ejemplos de fluidos biológicos que pueden ser estudiados mediante los anteriores inmunoensayos, se incluyen plasma, orina, sangre entera, sangre entera desecada, suero, líquido cerebroespinal, saliva, lágrimas, lavados nasales o extractos acuosos de tejidos y células.

Al mismo tiempo que se están detectando los anticuerpos, también se detectan los antígenos VHC; así, los métodos de la presente invención obvian la necesidad de realizar dos pruebas diferentes. Esto se consigue exponiendo la muestra de ensayo a una fase sólida (o fase líquida) revestida con anticuerpos específicos para el VHC (v.g., anticuerpos monoclonales humanos o animales para el núcleo, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, etc.). Los antígenos, si están presentes en la muestra, se unen a la fase sólida y pueden ser entonces detectados por un método directo o indirecto como se ha descrito anteriormente. Más específicamente, el método indirecto conlleva la adición de un conjugado consistente en un segundo anticuerpo (que se une al antígeno unido) unido a un marcaje o compuesto generador de señal. Cuando el segundo anticuerpo se une al antígeno unido, se genera entonces una señal detectable que indica la presencia de antígeno VHC en la muestra de ensayo.

Los anticuerpos que están depositados en la fase sólida, así como el "segundo anticuerpo" pueden ser, como se ha indicado anteriormente, anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales. Por ejemplo, si se elige utilizar anticuerpos monoclonales, éstos pueden ser seleccionados entre los anticuerpos monoclonales de Abbott 13-959-270, 14-1269-281, 14-1287-252, 14-153-234, 14-153-462, 14-1705-225, 14-1708-269, 14-1708-403, 14-178-125, 14-188-104, 14-283-112, 14-635-225, 14-726-217, 14-886-216, 14-947-104 y 14-945-218. También se pueden utilizar los siguientes anticuerpos monoclonales antinúcleo para los fines de la presente invención: 107-35-54, 110-81-17, 13-975-157, 14-1350-210 (véase la Patente EE.UU. Nº 5.753.430) y los monoclonales para el núcleo del VHC de Tonen C11-3, 7, 10, 14 y 15 (véase la Solicitud PCT WO 99/06836), todos ellos disponibles en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. (Para una discusión de la manera en que se pueden crear anticuerpos monoclonales, véase Kohler y Milstein, Nature (1975) 256: 494, revisado en Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, ed. Hurrell (CRC Press, Inc., 1982); véase también J.W. Goding, en Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Academic Press, N.Y., 1983; véase también la Patente EE.UU. Nº 5.753.430).

Habría que observar que la proteína del núcleo del VHC puede ser un posible objetivo de la porción de antígeno VHC del ensayo. Más concretamente, se consigue la detección de la proteína del núcleo utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epitopos dentro de la proteína del núcleo. Se ponen estos monoclonales antinúcleo sobre la fase sólida y facilitan la captura de las proteínas antigénicas del núcleo de la muestra de ensayo. Para la detección de anticuerpos para el VHC en la muestra de ensayo, también se pone proteína del núcleo del VHC recombinante sobre la fase sólida. Habría que observar, sin embargo, que existen problemas significativos asociados al uso de una sola proteína como diana para una prueba de antígenos y como reactivo de captura para la detección de anticuerpos, a saber, existe una "reactividad cruzada" significativa entre el antígeno del núcleo y los anticuerpos monoclonales antinúcleo depositados sobre la(s) fase(s) sólida(s). Esto da lugar a una señal falso-positiva, incluso en ausencia de la muestra de ensayo, ya que los anticuerpos monoclonales se unirán a epitopos presentes sobre la proteína recombinante.

Con objeto de evitar dicha reactividad cruzada, se puede modificar la proteína del núcleo usada en la porción de detección de anticuerpos del ensayo de tal forma que se elimine la capacidad de los monoclonales antinúcleo para unirse al núcleo del VHC. Se puede conseguir dicha modificación mediante el uso de tecnología de ADN recombinante, en donde se elimina o modifica la región epitópica (es decir, la corta secuencia de aminoácidos necesaria para la unión al anticuerpo monoclonal). Así, el uso de la proteína del núcleo recombinante modificada mantendría por consiguiente varios epitopos humanos a los que se unirían los anticuerpos presentes en el suero de individuos infectados; sin embargo, los anticuerpos monoclonales antinúcleo utilizados para la captura del antígeno no se unirían a la proteína modificada. Alternativamente, se podría reemplazar la proteína recombinante del núcleo del VHC con polipéptidos que incluyeran secuencias que se sabe se unen a los anticuerpos presentes en el suero de la mayoría de los individuos infectados, pero que no incluyeran secuencias que contuvieran los epitopos reconocidos por los monoclonales antinúcleo usados para detectar antígenos del núcleo del VHC.

Más específicamente, como se ha indicado anteriormente, con objeto de evitar la reactividad cruzada, se pueden usar antígenos del núcleo para la detección de anticuerpos en el ensayo. En particular, en la presente invención, la fase sólida puede ser revestida con las proteínas no estructurales (NS) 3, 4 y/o 5 (es decir, NS3, NS4 y/o NS5) y/o la proteína del núcleo. Alternativamente, se puede revestir la fase sólida con cualquiera de las proteínas del VHC antes

mencionadas, o segmentos o porciones de las mismas, ya sea individualmente o en combinación (para la detección de anticuerpos). Los antígenos usados para revestir la fase sólida pueden ser generados como una proteína recombinante contigua, expresados como proteínas recombinantes, ya sea como una sola entidad o como entidades discretas, o como péptidos sintéticos diseñados como una sola entidad o como entidades discretas.

5 También habría que observar que también se pueden detectar anticuerpos para VHC E2 en el ensayo combo. Así, utilizando el presente ensayo aquí descrito, se puede reemplazar un ensayo que detecte anticuerpo antinúcleo. Alternativamente, se puede suplementar dicho ensayo de anticuerpos antinúcleo con la porción de ensayo de antígenos del ensayo combo aquí descrito. (Véase, *v.g.*, la Patente EE.UU. N° 6.156.495 relacionada con la detección de anticuerpo o antígeno VHGB E2).

15 Con respecto a la detección de antígenos en la presente descripción, como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos monoclonales o policlonales depositados sobre la fase sólida no deben reconocer los antígenos del núcleo utilizados sobre la fase sólida (para la detección de anticuerpos). Así, por ejemplo, se puede usar el anticuerpo completo o un fragmento del mismo. (Para los fines de la presente invención, un "fragmento" o "porción" de un anticuerpo se define como una subunidad del anticuerpo que reacciona del mismo modo, funcionalmente, que el anticuerpo completo con respecto a las propiedades de unión).

20 Adicionalmente, también habría que hacer notar que el anticuerpo de captura inicial (para detectar antígenos VHC) usado en el inmunoensayo puede unirse covalente o no covalentemente (*v.g.*, unión iónica, hidrofóbica, etc.) a la fase sólida. Se conocen en la técnica agentes de conexión para la unión covalente, y éstos pueden formar parte de la fase sólida o ser derivatizados a ésta antes de su deposición.

25 El segundo modo de utilización de la fase sólida para la detección de anticuerpos para el VHC incluye la total eliminación de los antígenos del núcleo. Por ejemplo, se reviste la fase sólida con NS3, NS4 y/o NS5 y un sustituto para la proteína del núcleo o regiones de la misma (*v.g.*, E2). Por el contrario, los anticuerpos depositados sobre la fase sólida para la detección de antígeno se dirigen contra la proteína del núcleo del VHC.

30 Otros formatos de ensayo que pueden ser utilizados para los fines de la presente descripción, con objeto de detectar simultáneamente antígenos y anticuerpos, incluyen, por ejemplo, manchas en tiras de ensayo duales, una prueba rápida y un Western blot, así como el uso de partículas paramagnéticas en, por ejemplo, un ensayo Architect® (Frank Quinn, *The Immunoassay Handbook*, Segunda edición, editado por David Wild, páginas 363-367, 2001). Dichos formatos son conocidos para quienes tienen conocimientos ordinarios en la técnica.

35 También habría que hacer notar que los ensayos de la presente descripción pueden ser también usados para detectar únicamente antígenos VHC o anticuerpos para el VHC, en lugar de ambos, si se desea. Ciertamente, si se desea establecer que inicialmente existe una infección, se puede querer simplemente determinar la presencia de antígeno en una muestra de ensayo, tal como durante el "período de ventana". Por otra parte, si se quiere establecer la fase de la infección (*v.g.*, aguda frente a crónica), se puede desear buscar la presencia de anticuerpos y su título.

40 También habría que observar que los elementos del ensayo antes descrito son particularmente adecuados para uso en forma de kit. El kit puede también incluir un recipiente, tal como un vial, una botella o una tira, cada recipiente con una fase sólida preendurecida, y otros recipientes que contienen los respectivos conjugados. Estos kits pueden contener también viales o recipientes de otros reactivos necesarios para la realización del ensayo, tales como reactivos de lavado, de procesado e indicadores.

Los presentes métodos pueden ser ilustrados mediante el uso de los siguientes ejemplos no limitativos:

#### 50 Ejemplo I

Mapeo de epitopos del núcleo del VHC reconocidos por anticuerpos monoclonales

55 Para determinar la región dentro de la proteína del núcleo del VHC a la que se une cada uno de los anticuerpos monoclonales, se sintetizaron una serie de péptidos biotinilados solapantes (Tabla I). Se usaron estos péptidos para desarrollar EIA, como se describe más adelante. Habría que hacer notar que todos los monoclonales eran capaces de detectar una proteína de fusión recombinante del núcleo del VHC usando metodologías de EIA similares a la descrita más adelante (datos no mostrados).

Tabla I

Péptidos derivados del núcleo del VHC

Péptido	Secuencia	Región del núcleo representada
A	MSTNPKPQKKNKRNTRR (SEC. ID. N° 46)	1-18
B	NKRNTNRRPQDVKFPGGG (SEC. ID. N° 47)	11-28
C	DVKFPGGGQIVGGVYLLP (SEC. ID. N° 48)	21-38
D	VGGVYLLPRRGPRLGVRA (SEC. ID. N° 49)	31-48
E	GPRLGVRATRKTSEERSQP (SEC. ID. N° 50)	41-58
F	KTSEERSQPRGRRQPIPKA (SEC. ID. N° 51)	51-68
G	RRQPIKARRPEGRTWAQ (SEC. ID. N° 52)	61-78
H	PEGRTWAQPGYPWPLYGN (SEC. ID. N° 53)	71-88
I	QYPWPLYGNEGCGWAGWLL (SEC. ID. N° 54)	81-98
J	CGWAGWLLSPRGRSPSW (SEC. ID. N° 55)	91-107
1	WLLSPRGRSPSWGPTDPRRRSRNLG (SEC. ID. N° 56)	96-120
2	SWGPTDPRRRSRNLGKVIDTLTCGF (SEC. ID. N° 57)	106-130
3	SRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLV (SEC. ID. N° 58)	116-140
4	LTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAARA (SEC. ID. N° 59)	126-150
5	YIPLVGAPLGGAARALAHGVRVLED (SEC. ID. N° 60)	136-160
6	GAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLP (SEC. ID. N° 61)	146-170
7	LEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLA (SEC. ID. N° 62)	158-180
8	LPGCSFSIFLLALLSCLTVPASA (SEC. ID. N° 63)	169-191

5

Revestimiento de perlas de poliestireno: Se usaron perlas de poliestireno de un cuarto de pulgada como fase sólida para los EIA de péptidos. Antes del revestimiento, se lavaron las perlas con isopropanol al 15% (en agua) a temperatura ambiente durante 30 minutos sin agitación. Se eliminó el isopropanol y se aclararon las perlas una vez con agua desionizada. Se añadieron entonces las perlas lavadas a un vial que contenía el péptido diluido a 5 µg/ml en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5 (0,233 ml por perla). Se incubaron las perlas a 56°C durante 2 horas con mezcla de extremo sobre extremo. Se lavaron entonces las perlas tres veces con PBS y se incubaron después en PBS que contenía un 0,1% de Tritón X-100 a 40°C durante 1 hora con mezcla de extremo sobre extremo. Se lavaron de nuevo tres veces en PBS y se incubaron después a 40°C en BSA al 5%/PBS durante 1 hora mezclando extremo sobre extremo. Se lavaron las perlas cuatro veces con PBS y se incubaron luego a temperatura ambiente en PBS que contenía un 5% de sacarosa sin mezcla durante 20 minutos. Se eliminó el tampón de sacarosa y se secaron las perlas al aire. Se guardaron las perlas revestidas desecadas a 4°C.

10

15

20

Validación del revestimiento de perlas: Para determinar si los péptidos biotinilados se habían depositado realmente sobre las perlas, se realizó un ensayo en el que se incubaron perlas en tampón que contenía estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (200-400 ng/ml). Se lavaron entonces las perlas con agua desionizada y se añadió sustrato. Se detectó el producto por absorbancia a 492 nm. Todos los péptidos de la Tabla I mostraron estar depositados sobre las perlas de poliestireno mediante este ensayo (datos no mostrados).

25

30

35

EIA para péptidos del VHC: Se estudiaron anticuerpos monoclonales generados frente a una proteína del núcleo del VHC recombinante (véase el Ejemplo I) en cuanto a su capacidad para unirse a cada una de las perlas revestidas de péptido como sigue: se diluyeron los anticuerpos monoclonales a 50 ng/ml en tampón diluyente de muestra (tampón Tris que contenía un 20% de suero de cabra, un 10% de suero de ternera, un 0,2% de Tritón X-100 y azida sódica), de los que se añadieron 0,2 ml a un pocillo de reacción que contenía la perla revestida de péptido, y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con mezcla. Se lavaron entonces las perlas con agua desionizada, seguido de adición de 0,2 ml de IgG de cabra antirratón marcada con peroxidasa (0,3 µg/ml). Se incubaron las perlas a temperatura ambiente durante 60 minutos con mezcla. Se lavaron las perlas con agua desionizada, se transfirieron a tubos de plástico a los que se añadieron 0,3 ml de sustrato OPD (O-fenilendiamina 2 HCl al 0,3% en tampón citrato que contenía un 0,02% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. sin mezcla. Se detuvo la reacción mediante la adición de 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N y se determinó la DO a 492 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a la perla.

40

Mapeo peptídico de los monoclonales: Utilizando el ensayo antes descrito, se estudió cada uno de los monoclonales en cuanto a su capacidad para unirse a cada una de las perlas revestidas de péptido derivado del núcleo del VHC. Cuando se vio que un anticuerpo monoclonal se unía a una perla revestida de péptido específica, se hicieron diluciones seriadas de razón 10 del anticuerpo monoclonal, las cuales fueron luego estudiadas en cuanto a la unión al mismo péptido. Esto permitió la determinación de la especificidad de unión para cada anticuerpo monoclonal. Los resultados mostrados en la Tabla II indican la dilución más baja de anticuerpo monoclonal que exhibía unión (absorbancia de al menos 3 veces el fondo).

TABLA II

Mapeo peptídico de monoclonales antiinúcleo										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
	Péptido									
Monoclonal	aa1-18	aa11-28	aa21-37	aa31-48	aa41-57	aa51-68	aa61-78	aa71-88a	aa81-98	
14-1350-210A07	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
13-975-157A08	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
13-959-270A09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
110-81-17A15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
107-35-54A04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
14-1708-269A269	---	---	---	---	---	5 ng/ml	---	---	---	
14-1705-255A10	---	---	---	---	---	500 pg/ml	---	---	---	
14-1287-252A12	---	---	---	---	---	5 ng/ml	---	---	---	
14-1269-281A03	---	---	---	---	---	50 ng/ml	---	---	---	
14-947-104A16	---	---	---	---	---	500 pg/ml	---	---	---	
14-945-218A218	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
14-886-216A14	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
14-726-217A06	---	---	---	---	---	50 ng/ml	---	---	---	
14-635-225A05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
14-283-112A112	---	---	---	---	---	5 ng/ml	---	---	---	
14-188-104A11	---	---	---	---	---	5 ng/ml	---	---	---	
14-178-125A13	---	---	---	---	---	500 pg/ml	---	---	---	
14-153-234A234	---	---	---	---	500 pg/ml	---	---	---	---	
C11-3C11-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
C11-7C11-7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
C11-10C11-10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
C11-14C11-14	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
C11-15C11-15	---	50 mg/ml	---	---	---	---	---	---	---	
										Péptido
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Monoclonal	aa96-120	aa106-130	aa116-140	aa126-150	aa136-160	aa146-170	aa158-180	aa169-191		
14-1350-210A07	---	---	---	---	---	---	---	---		
13-975-157A08	---	50 ng/ml	---	---	---	---	---	---		
13-959-270A09	---	---	---	---	---	---	---	---		
110-81-17A15	50 ng/ml	5 ng/ml	---	---	---	---	---	---		
107-35-54A04	50 ng/ml	---	---	---	---	---	---	---		
14-1708-269A269	---	---	---	---	---	---	---	---		
14-1705-255A10	---	---	---	---	---	---	---	---		
14-1287-252A12	---	---	---	---	---	---	---	---		
14-1269-281A03	---	---	---	---	---	---	---	---		



**Ejemplo II**

Mapeo epitópico de anticuerpos monoclonales

## 5 A. Preparación de librería de fragmentos génicos del VHC.

Se digirió parcialmente un plásmido que contenía los nucleótidos 14-5294 de la cepa H del VHC (Ogata *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3392-3396 (1991)) en pGEM-9Zf(-) (Promega Corp., Madison, WI) usando ADNasa I mediante el método siguiente con objeto de obtener fragmentos codificantes de epitopos aleatorios:

10 Se incubaron alícuotas de 5 µg de ADN plasmídico a 15°C durante 10 minutos en Tris-HCl 0,5 M, pH 7,6, y MnCl<sub>2</sub> 10 mM en presencia de cualquier cantidad entre 0,1 y 0,7 unidades de ADNasa I. Se analizaron alícuotas de cada digestión por electroforesis en gel de agarosa. Se vio que las dos mezclas de digestión que contenían 0,6 y 0,7 unidades de ADNasa I daban la mayor cantidad de fragmentos en el rango de 50-200 pb. Estas dos mezclas fueron  
15 reunidas y extraídas una vez con igual volumen de fenolcloroformo (1:1, v/v) y luego precipitadas por adición de una décima parte en volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol al 100%, seguido de centrifugación a 14.000 x g durante 10 minutos. Se hicieron luego romos los extremos de las moléculas de ADN usando el kit PCR Polishing (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) según las instrucciones del fabricante. Se volvió a extraer y a precipitar el ADN como se ha descrito anteriormente, seguido de ligación a un adaptador de doble hebra en un volumen de  
20 reacción de 10 µl usando un kit de T4 ADN ligasa (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) según las instrucciones del fabricante. La secuencia de este adaptador de doble hebra era:

5'-GATCGCTCGAATTCCTCG-3' (SECUENCIA ID N° 44)  
3'-TTCTAGCGAGCTTAAGGAGC-5' (SECUENCIA ID N° 45)

25 Se usó entonces el oligonucleótido de la hebra sentido del adaptador (SEC. ID. N° 44) como cebador en una reacción de PCR, de tal forma que todos los ADN fueron amplificados independientemente de su secuencia. Este método es una modificación del descrito por Akowitz *et al.*, Gene 81: 295-306 (1989), y Reyes *et al.*, Mol. Cell. Probes 5: 473-481 (1991). Se realizó la PCR en presencia del cebador oligonucleotídico de la hebra sentido a una  
30 concentración final de 1 µM en un volumen de reacción de 100 µl usando el kit de PCR GeneAmp Gold (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante en un termociclador PE-9600. Tras una preincubación a 94°C durante 8 min., se realizaron veinticinco ciclos de PCR como sigue: desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1,0 min. A continuación, se realizó una etapa de extensión final a 72°C durante 10 min. Se extrajo y precipitó el producto de la PCR como se  
35 ha descrito anteriormente. Se llevó a cabo la totalidad de la PCR en un gel de agarosa al 1,2% y se retiró una rodaja de gel que contenía fragmentos de ADN de entre aproximadamente 70 y 250 pb. Se extrajo el ADN de la rodaja de gel usando el kit QIAEX II (QIAGEN, Inc., Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Se digirió el ADN con la enzima de restricción EcoRI (New England Biolabs, Beverly, MA) según las instrucciones del fabricante. Se extrajo y precipitó entonces el ADN digerido como se ha descrito anteriormente.

40 Se digirió T7Select10-3b (Novagen, Inc., Madison, WI) con EcoRI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina intestinal de ternera (New England Biolabs, Beverly, MA) según las instrucciones del fabricante. Se ligaron fragmentos de ADN digeridos seleccionados por tamaño (30 ng) (supra) con 0,5 µg de T7Select10-3b digerido en un volumen de reacción de 5 µl a 16°C durante la noche. Se empaquetó la totalidad del ligado en cabezas de fago usando extracto de  
45 empaquetamiento T7Select (Novagen, Inc., Madison, WI) y se tituló según las instrucciones del fabricante. La librería no amplificada resultante contenía un total de  $3,9 \times 10^6$  miembros (PFU). Se amplificaron los fagos empaquetados por amplificación de lisados líquidos en *E. coli* BLT5403 (20 ml de cultivo) según las instrucciones del T7 Select System Manual (Novagen, Inc., Madison, WI). La librería amplificada tenía un título de  $1,3 \times 10^{11}$  PFU por ml.

## 50 B. Biopurificación de librería de fragmentos génicos del VHC.

Se incubó cada anticuerpo monoclonal (20 µg) que había de ser utilizado para la biopurificación a 4°C durante 4 horas en un balancín de extremo sobre extremo en 300 µl de tampón de bloqueo (2% de BSA, 3% de leche  
55 deshidratada desnatada, 0,2% de Tween 20 y 0,02% de azida sódica en solución salina tamponada con fosfatos). Durante la incubación del anticuerpo monoclonal, se precipitó una alícuota de la librería de fragmentos génicos del VHC amplificada (supra) que contenía aproximadamente  $10^{11}$  fagos como sigue: se añadió 1/10 del volumen de NaCl 5 M a los fagos y se mezclaron bien, seguido de adición de 1/6 del volumen de polietilenglicol (PM 8.000), se mezcló bien de nuevo y se incubó sobre hielo durante 1-2 horas. Se centrifugaron los fagos a 6.000 x g durante 10  
60 min. a temperatura ambiente, se eliminó todo el sobrenadante y se resuspendió vigorosamente la pella de fagos en 120 µl de tampón que contenía NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM. Se añadieron los fagos al anticuerpo monoclonal preincubado y se incubaron a 4°C durante la noche en un balancín de extremo sobre extremo.

65 A la mañana siguiente, se capturaron los complejos anticuerpo-fago sobre partículas paramagnéticas copuladas a IgG de cabra antirratón (específica para Fc) como sigue. Se lavó una alícuota de 0,2 ml de partículas BioMag de Fc de IgG

de cabra antirratón (Polysciences, Inc., Warrington, PA) tres veces con 0,4 ml de Tween 20 al 0,1%, BSA al 0,1% y azida sódica al 0,02% en solución salina tamponada con fosfatos (PBS) agitando suavemente en vórtice, seguido de captura sobre un soporte magnético durante 0,5-1 minuto. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante sin alterar las partículas. Se resuspendieron entonces las partículas en la IgG-fago de la anterior incubación durante la noche y se incubaron a temperatura ambiente en un balancín de extremo sobre extremo durante 3 horas. Se lavaron las partículas seis veces como antes usando 6,0 ml de Tween 20 al 0,5% y BSA al 0,1% en PBS por lavado. Se eluyeron los fagos unidos usando 0,2 ml de Tween 20 al 0,1%, BSA al 0,1% y SDS al 1,0% en PBS a temperatura ambiente en un balancín de extremo sobre extremo durante 90 minutos. Se puso el tubo sobre un soporte magnético durante 1-2 minutos, después de lo cual se trasladó el sobrenadante que contenía los fagos eluidos a un tubo limpio. Se tituló la muestra que contenía los fagos eluidos como se instruye en el T7 Select System Manual.

Se amplificó el fago eluido como sigue. Se inocularon 10 ml de caldo LB (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) más 100 µg/ml de ampicilina con *E. coli* BLT5403 y se incubaron a 37°C durante la noche con agitación. A la mañana siguiente, se inocularon 35 ml de caldo LB más 100 µg/ml de ampicilina, sales M9 1X, 0,4% de glucosa y MgSO<sub>4</sub> 1 mM con 0,2 ml del cultivo realizado durante la noche y se incubaron a 37°C con agitación hasta que la absorbancia A600 fue de 0,5-0,6. Se añadió el fago eluido (185 µl) de la primera tanda de biopurificación (supra) y se continuó incubando a 37°C durante 1,5-2 horas, hasta que la absorbancia A600 del cultivo hubo caído a aproximadamente 0,5, lo que indica lisis. Se centrifugó el cultivo a 8.000 x g durante 10 minutos y se trasladó el sobrenadante a un tubo limpio y se guardó a 4°C. Se tituló el sobrenadante del cultivo según las instrucciones del T7 Select System Manual.

Se realizaron de una a dos tandas posteriores de biopurificación y amplificación como antes, con las siguientes modificaciones. Tras prebloquear el anticuerpo monoclonal durante 4 horas a 4°C, se añadieron 150 µl de fago amplificado de la tanda previa de biopurificación en lugar de 10<sup>11</sup> fagos precipitados con PEG de la librería de partida. Además, después de la biopurificación, se usaron 20 ml de cultivo en lugar de 35 ml de cultivo para amplificar el fago eluido, y se añadieron 100 µl en lugar de 185 µl de fago eluido al cultivo.

C. Selección y secuenciación de clones que contienen núcleo del VHC.

Se utilizó un fragmento de ADN que contenía una región del genoma del VHC que codifica los aminoácidos 1-173 de la proteína de la nucleocápside del VHC como sonda de hibridación. Se escogió esta región porque todos los anticuerpos monoclonales analizados en los experimentos de biopurificación reconocen epítopos en la proteína del núcleo del VHC. Se plaquearon los fagos resultantes de 2-3 tandas de biopurificación y amplificación en *E. coli* BLT5403 y se incubaron a 37°C hasta que se formaron placas. Se transfirió el ADN a membranas Hybond-N+ (Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, IL), se desnaturalizó, se neutralizó y se entrecruzó con UV, según la descripción del fabricante. Se prehibridaron las membranas, se hibridaron con la sonda marcada con <sup>32</sup>P del gen de la nucleocápside del VHC, se lavaron y se expusieron como se describe y conoce en la técnica. Se aislaron las placas de hibridación individuales y se amplificaron los insertos por PCR usando los cebadores T7SelectUP y T7SelectDOWN (Novagen, Inc., Madison, WI) según se instruye en el T7Select System Manual. Por cada anticuerpo monoclonal, se amplificaron 30-50 placas de hibridación independientes y se purificaron después usando el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA). Se secuenciaron los productos de PCR purificados directamente en un Secuenciador de ADN ABI Modelo 377 usando el kit ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer) y el cebador T7SelectUP. Se alinearon todas las secuencias resultantes de la biopurificación con un anticuerpo monoclonal particular con la secuencia del gen de la nucleocápside del VHC y se identificó la región mínima de solapamiento entre todos los clones. Esta región de solapamiento definía el epítopo reconocido por el anticuerpo monoclonal. En la Tabla III se muestran los epítopos reconocidos por varios anticuerpos monoclonales identificados usando este método.

Tabla III

Anticuerpo monoclonal	Región del núcleo del VHC reconocida
C11-15	Aminoácidos 19-27
C11-10	Aminoácidos 32-36
C11-14	Aminoácidos 45-50
C11-3	Aminoácidos 104-110
C11-7	Aminoácidos 112-124
14-635-225	Aminoácidos 49-53
14-153-462	Aminoácidos 50-63
14-726-217	Aminoácidos 57-63
14-178-125	Aminoácidos 59-64
14-1269-281	Aminoácidos 59-64
14-947-104	Aminoácidos 59-64
14-188-104	Aminoácidos 59-64
14-1708-269	Aminoácidos 59-64
107-35-54	Aminoácidos 102-109

**Ejemplo III**

Construcción de antígenos recombinantes para uso en un ensayo de combinación anticuerpo/antígeno del núcleo del VHC

5

**A. Antecedentes.**

La respuesta inmune humana al núcleo del Virus de la Hepatitis C (VHC) es, en su mayor parte, exclusiva para la mitad N-terminal de la proteína nativa. Se han identificado múltiples epitopos (regiones que comprenden un número definido de aminoácidos, normalmente <10) dentro de los primeros 115 aminoácidos de la proteína nativa (Sallberg *et al.*). Por lo tanto, los antígenos recombinantes utilizados en los ensayos para la detección de anticuerpos humanos antinúcleo presentes en el suero de individuos infectados sólo necesitan contener esta porción de la proteína nativa. Por el contrario, los ensayos *in vitro* para la detección de la proteína del núcleo del VHC utilizan anticuerpos monoclonales murinos para capturar y detectar la proteína del núcleo nativa también presente en el suero de individuos infectados. Los ensayos de combinación para la detección simultánea tanto del antígeno del núcleo como del anticuerpo humano antinúcleo en un solo ensayo combinan los dos formatos de ensayo. En este caso, es necesario un antígeno del núcleo recombinante que sea reconocido por los anticuerpos humanos antinúcleo presentes en el suero, pero que al mismo tiempo escape al reconocimiento por los anticuerpos monoclonales murinos utilizados para capturar y detectar el antígeno del núcleo nativo también presentes en el suero. Dichos recombinantes pueden ser construidos eliminando pequeñas regiones (1-30 o más aminoácidos) dentro del antígeno del núcleo, alterando así o eliminando el/los epitopo(s) reconocido(s) por los anticuerpos monoclonales murinos y dejando al mismo tiempo sin alterar muchos otros epitopos que permitirán la detección de anticuerpos humanos antinúcleo.

**B. Construcción de antígenos.**

El primero de estos antígenos construido contenía los aminoácidos 8-100 del VHC, en donde los aminoácidos 32-50 se habían suprimido del recombinante. De este modo, los anticuerpos C11-10 y C11-14, que se unen a epitopos en los aminoácidos 32-36 y 45-50, respectivamente (Ejemplo II), no se unirán al antígeno recombinante resultante. Se usó un plásmido que contenía una versión optimizada por codones bacterianos de los nucleótidos 342-791 de la cepa H de VHC (Ogata, *supra* (1991)) como plantilla para la PCR. Se utilizaron cebadores oligonucleotídicos diseñados para esta secuencia con objeto de amplificar dos fragmentos distintos (1 = SEC. ID. Nº 1 y SEC. ID. Nº 2; 2 = SEC. ID. Nº 3 y SEC. ID. Nº 4) del antígeno del núcleo del VHC, una secuencia arriba de la delección y el otro secuencia abajo de la delección. Adicionalmente, los cebadores oligonucleotídicos que flanquean a la delección en cada fragmento (SEC. ID. Nº 2 y SEC. ID. Nº 3) contenían regiones de solapamiento mutuo. Se llevó a cabo la PCR en un termociclador PE-9600 en presencia de 0,5 µM de cada cebador oligonucleotídico y 3-5 pg de plantilla de plásmido utilizando el kit TaKaRa LA Taq PCR (Pan Vera, Corp., Madison, WI) según las instrucciones del fabricante (volumen de 50 µl). Tras una preincubación a 94°C durante 1 minuto, se realizaron 35 ciclos de PCR (desnaturalización a 94°C durante 20 segundos; hibridación a 50°C durante 30 segundos; extensión a 72°C durante 30 segundos), seguidos luego de una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Después de la amplificación independiente de los dos fragmentos, se purificó cada uno de ellos usando el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Inc., Valencia, CA) y se eluyeron en 25 µl de agua. Se realizó entonces una segunda tanda de PCR como antes durante 10 ciclos para ligar los dos fragmentos purificados (1 µl de cada uno en un volumen de reacción de 20 µl) entre sí en las regiones de solapamiento dentro de los cebadores oligonucleotídicos (SEC. ID. Nº 2 y SEC. ID. Nº 3). Finalmente, se amplificó el producto de la segunda PCR en una tercera PCR durante 35 ciclos utilizando 0,5 µM de los cebadores oligonucleotídicos flanqueantes (SEC. ID. Nº 1 y SEC. ID. Nº 4) y las condiciones antes descritas (volumen de 100 µl).

**C. Expresión recombinante.**

Se purificó el producto de la tercera PCR usando el kit QIAquick PCR Purification y se digirió luego con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, sitios de digestión que se incorporaron en los cebadores oligonucleotídicos flanqueantes (SEC. ID. Nº 1 y SEC. ID. Nº 4). Se ligó el fragmento codificante del recombinante en el vector de expresión bacteriano pJO200, que había sido digerido de manera similar con EcoRI y BamHI, usando el kit pGEM-T Easy Ligation (Promega, Madison, WI), y se transformó después en células competentes XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA). Tras la selección de clones que contenían los insertos de tamaño apropiado, se confirmó la secuencia nucleotídica del recombinante (SEC. ID. Nº 5), que exhibía la secuencia de aminoácidos deducida (SEC. ID. Nº 6). (Véanse la Patente EE.UU. Nº 5.322.769 y la Patente EE.UU. Nº 6.172.189 para una descripción de la expresión de proteínas recombinantes).

**D. Otros recombinantes.**

Se han construido, clonado y expresado otros varios recombinantes del núcleo del VHC de un modo idéntico al descrito anteriormente. El primero de éstos (véanse la secuencia de nucleótidos SEC. ID. Nº 7 y la correspondiente secuencia de aminoácidos SEC. ID. Nº 8) contiene los aminoácidos 8-100 del VHC, en donde los aminoácidos 33-35

65

y 46-49 han sido suprimidos. Los cebadores oligonucleotídicos utilizados para amplificar los dos fragmentos en la primera PCR eran la SEC. ID. Nº 1 y la SEC. ID. Nº 9 y la SEC. ID. Nº 10 y la SEC. ID. Nº 4, respectivamente, seguido de amplificación final en la tercera PCR con la SEC. ID. Nº 1 y la SEC. ID. Nº 4. El segundo de estos recombinantes (véanse la secuencia de nucleótidos SEC. ID. Nº 11 y la correspondiente secuencia de aminoácidos SEC. ID. Nº 12) codifica los aminoácidos 8-100 del VHC, en donde el residuo de leucina en el aminoácido 36 ha sido substituido con valina y el residuo de arginina en el aminoácido 47 ha sido substituido con leucina. Los cebadores oligonucleotídicos utilizados para amplificar los dos fragmentos en la primera PCR eran la SEC. ID. Nº 1 y la SEC. ID. Nº 13 y la SEC. ID. Nº 14 y la SEC. ID. Nº 4, respectivamente, seguido de amplificación final en la tercera PCR con la SEC. ID. Nº 1 y la SEC. ID. Nº 4. Finalmente, se construyó un recombinante (véanse la secuencia de nucleótidos SEC. ID. Nº 15 y la correspondiente secuencia de aminoácidos SEC. ID. Nº 16) codificante de los aminoácidos 8-100 del VHC usando los cebadores oligonucleotídicos SEC. ID. Nº 1 y SEC. ID. Nº 4 en una sola reacción PCR.

#### Ejemplo IV

Construcción de antígenos recombinantes adicionales para uso en un ensayo de combinación anticuerpo/antígeno del núcleo del VHC

##### A. Antecedentes.

Como antígenos recombinantes adicionales construidos para uso en un ensayo de combinación antígeno/anticuerpo de VHC, se incluían antígenos que contenían la región 33c del VHC (aminoácidos 1192-1457) ligada a una región del núcleo del virus. La plantilla usada para dichas construcciones era un plásmido que contenía una secuencia optimizada por codones bacterianos de los aminoácidos 1192-1457, seguida de los aminoácidos 1-150 de la cepa H del VHC (Ogata, 1991), con dos aminoácidos no codificados por el VHC separando las dos secuencias. Este recombinante (HC-43) es utilizado rutinariamente en múltiples ensayos comerciales para la detección del VHC. El recombinante HC43 se expresa como una proteína no de fusión del promotor pL del fago lambda bacteriano. (Véanse la Patente EE.UU. Nº 5.705.330, la Patente EE.UU. Nº 5.616.460 y la Patente EE.UU. Nº 5.773.212 para una discusión de HC43 y la Patente EE.UU. Nº 6.153.377 y la Patente EE.UU. Nº 5.859.193 para una discusión del sistema vector lambda pL). Se construyeron los recombinantes adicionales por uno de dos métodos. Primeramente, se unieron clones existentes codificantes de distintos recombinantes relacionados por ligación de ADN para formar un tercer recombinante único, o se construyeron nuevos clones únicos por la PCR de ligado descrita en el Ejemplo III, Parte B.

##### B. Construcción inicial de antígenos.

El primero de los antígenos más nuevos construido (p9MB-18) contenía los aminoácidos 1192-1457 del VHC (que representan un segmento de NS3) ligados a los aminoácidos 1-100 (que representan un segmento de la proteína del núcleo), en donde se habían suprimido los aminoácidos 32-50. Se construyó este recombinante por restricción del plásmido pHC43 con las endonucleasas Xma I y Bam HI. Xma I corta pHC43 cerca del aminoácido 24 de la región codificante del núcleo, mientras que *Bam* HI corta secuencia abajo del codón de finalización de la traducción. Esta región de pHC43 fue substituida por ligación de ADN usando el kit pGEM-T Easy Ligation (Promega Corp., Madison, WI) con el fragmento Xma I-Bam HI obtenido del vector pJO200 codificante de los aminoácidos 8-100 del núcleo del VHC con delección de los 32-50 descrito en el Ejemplo III (SEC. ID. Nº 5 y SEC. ID. Nº 6). Se usó entonces el nuevo plásmido para transformar células competentes XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA). Tras la selección de clones que contenían el inserto de tamaño apropiado, se confirmó la secuencia de nucleótidos del recombinante (SEC. ID. Nº 17), que exhibía la secuencia de aminoácidos deducida en la SEC. ID. Nº 18.

##### C. Otros recombinantes construidos por PCR de ligado.

Se construyeron antígenos recombinantes hechos por PCR de ligado como se detalla en el Ejemplo III, Parte B. El primero de estos recombinantes, p9MB-19 (SEC. ID. Nº 19 (secuencia de nucleótidos) y SEC. ID. Nº 20 (secuencia de aminoácidos)), contiene los aminoácidos 1192-1457 del VHC, seguidos de los aminoácidos 8-100, en donde se habían suprimido los aminoácidos 32-50. Los cebadores oligonucleotídicos usados para amplificar los dos fragmentos iniciales en la primera PCR eran la SEC. ID. Nº 21 y la SEC. ID. Nº 22 y la SEC. ID. Nº 23 y la SEC. ID. Nº 4, respectivamente. La amplificación final en la tercera PCR utilizó los cebadores oligonucleotídicos SEC. ID. Nº 21 y SEC. ID. Nº 4.

El p9MB-20 recombinante (SEC. ID. Nº 24 y SEC. ID. Nº 25) contiene los aminoácidos 1192-1457 del VHC, cuatro residuos de glicina y un residuo de serina, seguidos de los aminoácidos 8-100 del VHC, en donde se habían suprimido los aminoácidos 32-50. Los cebadores oligonucleotídicos usados para amplificar los dos fragmentos iniciales en la primera PCR eran la SEC. ID. Nº 21 y la SEC. ID. Nº 22 y la SEC. ID. Nº 26 y la SEC. ID. Nº 4, respectivamente. La amplificación final en la tercera PCR utilizó los cebadores oligonucleotídicos SEC. ID. Nº 21 y SEC. ID. Nº 4.

El p9MB-22 recombinante (SEC. ID. Nº 27 y SEC. ID. Nº 28) contiene los aminoácidos 1192-1457 del VHC, cuatro residuos de glicina y un residuo de serina, seguidos de los aminoácidos 1-150 del VHC. Los cebadores

oligonucleotídicos usados para amplificar los dos fragmentos iniciales en la primera PCR eran la SEC. ID. N° 21 y la SEC. ID. N° 22 y la SEC. ID. N° 29 y la SEC. ID. N° 30, respectivamente. La amplificación final en la tercera PCR utilizó los cebadores oligonucleotídicos SEC. ID. N° 21 y SEC. ID. N° 30.

5 El p9MB-31 recombinante (SEC. ID. N° 31 y SEC. ID. N° 32) contiene los aminoácidos 1192-1457 del VHC, seguidos de los aminoácidos 1-100, en donde se habían suprimido los aminoácidos 31, 32, 33, 47 y 48. Los cebadores oligonucleotídicos usados para amplificar los dos fragmentos iniciales en la primera PCR eran la SEC. ID. N° 21 y la SEC. ID. N° 33 y la SEC. ID. N° 34 y la SEC. ID. N° 4, respectivamente. La amplificación final en la tercera PCR utilizó los cebadores oligonucleotídicos SEC. ID. N° 21 y SEC. ID. N° 4.

10 D. Otros recombinantes construidos por ligación de ADN.

15 El 9MB-24 recombinante (SEC. ID. N° 35 y SEC. ID. N° 36) contiene los aminoácidos 1192-1457 del VHC, seguidos de los aminoácidos 1-100, en donde se habían suprimido los aminoácidos 33-35 y 46-49 del recombinante. Se construyó este recombinante por restricción del plásmido pH43 con las endonucleasas Xma I y Bam HI y reemplazo del fragmento por ligación de ADN con el fragmento Xma I-Bam HI obtenido de la SEC. ID. N° 7.

20 El 9MB-25 recombinante (SEC. ID. N° 37 y SEC. ID. N° 38) contiene los aminoácidos 1192-1457 del VHC, cuatro residuos de glicina y un residuo de serina, seguidos de los aminoácidos 1-100 del VHC, en donde se habían suprimido los aminoácidos 33-35 y 46-49 del recombinante. Se construyó este recombinante por restricción del plásmido p9MB-22 con las endonucleasas Xma I y Bam HI y reemplazo del fragmento por ligación de ADN con el fragmento Xma I-Bam HI obtenido de la SEC. ID. N° 7.

25 El 9MB-26 recombinante (SEC. ID. N° 39 y SEC. ID. N° 40) contiene los aminoácidos 1192-1457 del VHC, cuatro residuos de glicina y un residuo de serina, seguidos de los aminoácidos 1-100 del VHC, en donde se habían suprimido los aminoácidos 32-50 del recombinante. Se construyó este recombinante por restricción del plásmido p9MB-22 con las endonucleasas Xma I y Bam HI y reemplazo del fragmento por ligación de ADN con el fragmento Xma I-Bam HI obtenido de p9MB-18 (SEC. ID. N° 17).

### 30 **Ejemplo V**

#### Preparación de micropartículas

35 Se prepararon micropartículas, revestidas con diversos anticuerpos monoclonales, revistiendo diversas poblaciones independientes de micropartículas con anticuerpos monoclonales para el VHC que reconocen diferentes regiones dentro de la proteína del núcleo del VHC. De forma similar, se revistieron micropartículas con antígenos recombinantes clonados a partir de las regiones NS3 y NS4 del VHC. El péptido usado para el revestimiento de las micropartículas era de la región del núcleo del VHC.

40 Micropartículas para el ensayo de anticuerpos:

Se usaron las siguientes proteínas y péptidos recombinantes para revestir las micropartículas para los ensayos de anticuerpos.

45 A. Preparación de proteínas recombinantes:

i. Antígeno HC43 del VHC. Se obtuvo el antígeno recombinante HC43 del VHC de Chiron Corporation, Emeryville, CA. Contenía la secuencia de aminoácidos 1-150 (correspondiente a la proteína del núcleo) y 1192-1457 (correspondiente a los residuos de aminoácidos en NS3) del VHC-1 (secuencia de aminoácidos disponible en el GenBank<sup>®</sup>, como se ha descrito aquí con anterioridad).

50 ii. Antígeno C-100 del VHC. Se obtuvo el antígeno recombinante C-100 del VHC de Chiron Corporation, Emeryville, Calif. Contenía la secuencia de aminoácidos 1569-1961 (correspondiente a los residuos de aminoácidos en NS4) del VHC-1 (disponible en el GenBank<sup>®</sup>, como se ha descrito aquí con anterioridad).

55 iii. Antígeno NS5 del VHC. Se obtuvo el antígeno recombinante NS5 del VHC de Chiron Corporation, Emeryville, Calif. Contenía la secuencia de aminoácidos 2054-2995 del VHC (disponible en el GenBank<sup>®</sup>, como se ha descrito aquí con anterioridad).

60 iv. Antígeno CKS-33c-BCD de construcción *E. coli* NS3 NS4 VHC. Se obtuvo el antígeno recombinante HC31 del VHC de Chiron Corporation, Emerville, Calif. Contenía la secuencia de aminoácidos 1192-1457 del VHC y la secuencia de aminoácidos 1676-1931 de la región NS4. Además, consiste en 239 aminoácidos de CKS (disponible en el GenBank<sup>®</sup>, como se ha descrito aquí con anterioridad).

65 A1. Preparación de micropartículas revestidas de antígeno R.

i. Preparación de micropartículas de HC43/C100 del VHC. Se prepararon micropartículas revestidas tanto con HC43 como con C-100 del siguiente modo. Para explicarlo brevemente, se mezcló una alícuota de 500  $\mu$ l de micropartículas (10% peso/volumen, 0,7-0,9 micras, de Seradyn, Indianápolis, Ind.) con 962  $\mu$ l de un tampón de revestimiento (tampón fosfato, pH 5,0, con Tween-20) durante aproximadamente 1 minuto a temperatura ambiente. Se añadieron entonces 154  $\mu$ l de una solución de antígeno C100-3 del VHC (0,65 mg/ml) y 308  $\mu$ l de una solución de antígeno HC43 (650  $\mu$ g/ml) a la solución de micropartículas, se mezclaron y se voltearon durante 16 horas a temperatura ambiente. Se centrifugaron las micropartículas a 12.000 X g durante 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Se retiró la suspensión y se lavaron las micropartículas con tampón de lavado (fosfato, NaCl, ditiotritol-DTT, EDTA, dodecilsulfato de sodio-SDS, pH 6,5) y se estresaron por calor a 56°C durante 20 horas. Se resuspendieron entonces las micropartículas en 2,5 ml de diluyente de micropartículas (tampón fosfato, pH 6,5, EDTA, DTT, NaCl y SDS, sacarosa, azida) a una concentración final del 2,0%.

ii. Preparación de micropartículas de NS5 del VHC. Se añadieron 530  $\mu$ l de un tampón de revestimiento de NS5 del VHC (carbonato, pH 10, SDS) y 200  $\mu$ l de micropartículas de 0,7-0,9 micras al 10% peso/volumen (de Seradyn, Indianápolis, Ind.) a 270  $\mu$ l de la solución de antígeno NS5 del VHC (concentración de 650  $\mu$ g/ml). Se mezclaron las micropartículas y se voltearon durante 16 horas a temperatura ambiente. Se centrifugaron las micropartículas a 12.000 X g durante 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Se retiró la suspensión y se lavaron las micropartículas con tampón de lavado (fosfato, NaCl, DTT, EDTA, SDS, pH 6,5) y se estresaron por calor a 56°C durante 20 horas. Se resuspendieron entonces las micropartículas lavadas en 2,5 ml de diluyente de micropartículas (tampón fosfato, pH 6,5, EDTA, DTT, NaCl y SDS, sacarosa, azida) a una concentración final del 0,4%.

iii. Preparación de micropartículas de CKS-33c-BCD de construcción *E. coli* NS3 NS4 VHC. Se mezcló una alícuota de 100  $\mu$ l de micropartículas (10% peso/volumen, 0,7-0,9 micras, de Seradyn, Indianápolis, Ind.) con 452  $\mu$ l de tampón de revestimiento (tampón fosfato, pH 5,0, con Tween-20) durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron luego 200  $\mu$ g de Ag CKS-33C-BCD y se mezclaron durante 16 horas a temperatura ambiente. Se centrifugaron las micropartículas a 12.000 X g durante 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Se lavaron las micropartículas preparadas con tampón de lavado (DTT, EDTA, SDS en PBS, pH 6,5). Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las micropartículas en 1 ml de diluyente de micropartículas (tampón fosfato, pH 6,5, EDTA, DTT, NaCl, sacarosa y SDS, sacarosa).

iv. Mezcla de micropartículas de HC43/C100 del VHC y de NS5 del VHC. Se mezclaron entre sí 220  $\mu$ l de micropartículas de HC43/C100 del VHC preparadas como se describe en el Ejemplo (IV) (A1) (i) y 330  $\mu$ l de micropartículas NS5 del VHC preparadas como se describe en el Ejemplo (IV) (A1) (ii). Se incubó esta mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos y se diluyó a 50 ml en diluyente de micropartículas (tampón fosfato, pH 6,5, EDTA, DTT, NaCl, sacarosa y SDS, sacarosa).

v. Preparación de péptido del núcleo biotinilado. Se biotiniló el péptido del núcleo del VHC de aa 11-28 en el extremo N durante la síntesis utilizando un sintetizador de péptidos automatizado con una pureza del 90%.

vi. Preparación de micropartículas revestidas de estreptavidina. Se mezcló una alícuota de 4 ml de micropartículas carboxiladas (10% peso/volumen, 0,227 micras, Seradyn, Indianápolis, Ind.) con 2.486  $\mu$ l de tampón de copulación (MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), pH 6,7) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron entonces 114,4  $\mu$ l de solución de EDAC (10 mg/ml en tampón de copulación) a la solución de micropartículas y se mezclaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 ml de solución de estreptavidina (1 mg/ml en PBS) a las micropartículas activadas y se voltearon durante 16 horas a temperatura ambiente. Se centrifugaron luego las micropartículas preparadas a 12.000 X g durante 3 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las micropartículas en 4 ml de PBS. Se repitió el proceso de centrifugación una vez más y se almacenaron las micropartículas en 4 ml de PBS, para tener una concentración final de aproximadamente el 1%.

vii. Preparación de micropartículas revestidas de péptido del núcleo.

A 1 ml de micropartículas revestidas del Ejemplo (IV) (A1) (vi), se le añadieron 375  $\mu$ l de péptido del núcleo del VHC del Ejemplo (V) (A1) (v) y de 11-28 aa a 1 mg/ml en tampón PBS. Se incubó entonces la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las micropartículas preparadas con tampón de lavado (DTT, EDTA, SDS en PBS, pH 6,5) y se resuspendieron las micropartículas en 1 ml de diluyente de micropartículas (suero bovino de ternera, IgG de caballo, Tween 20, BSA, Caseína, EDTA, sacarosa y proclina, pH 6,5), para tener una concentración final del 1% en sólidos.

60 Micropartículas para el ensayo de antígenos:

B. Preparación de anticuerpos monoclonales:

Los métodos para generar anticuerpos monoclonales han sido presentados en la Patente EE.UU. Número 5.753.430. Para explicarlo brevemente, se emplearon antígenos recombinantes derivados de *E. coli* codificados por

secuencias del VHC, designados como pHCV34 (núcleo del VHC, aa. 1-150), como inmunógenos para anticuerpos para el núcleo. Se da una información detallada sobre la clonación de pHCV34 en la Solicitud de Patente EE.UU. N° de Serie 07/572.822, aquí incorporada como referencia). Se preparó la proteína para inmunización con adyuvantes apropiados tras la purificación, como lo realizarían los expertos en la técnica.

Se inyectaron ratones BALB/c intraperitonealmente con 15 µg de pHCV34 purificado con 15 µg de cada de dimicolato de trehalosa (TDM) y *M. phlei* en una emulsión tampón preparada según las instrucciones del fabricante. Se realizaron inmunizaciones posteriores los días 14, 28 y 42. Los ratones fueron sangrados los días 21 y 49 y se estudió la respuesta inmune mediante un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas utilizando pHCV34 depositado sobre perlas de poliestireno, según se detalla en la Patente EE.UU. N° 5.753.430.

Al demostrar la presencia de anticuerpo anti-VHC específico en títulos razonables en los sueros de los ratones inmunizados, se dio a los ratones un refuerzo con 40 µg de antígeno pHCV34. Los ratones fueron sacrificados y se les extirparon los bazo; se mezclaron y fusionaron las células blancas con células SP2/0. Se cultivó la mezcla de células en Medio de Dubach modificado de Biscoe (IMDM) suplementado con un 20% de suero de ternera fetal, y se seleccionaron las células hibridadas utilizando un medio de hipoxantina y timidina. Se establecieron líneas celulares de hibridoma y se prepararon todos los anticuerpos monoclonales específicos para anticuerpos para el núcleo a partir de los líquidos ascíticos de los ratones y se purificaron por cromatografía en una columna de proteína A (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se analizaron los epitopos de los anticuerpos monoclonales por una prueba de ELISA descrita en el Ejemplo I.

B1. Preparación de micropartículas revestidas de anticuerpos monoclonales para el ensayo de antígenos.

i. Preparación de micropartículas de C11-14 del VHC. Resumiendo, se mezcló una alícuota de 1 ml de micropartículas carboxiladas (10% peso/volumen, 0,227 micras, de Seradyn, Indianápolis, Ind.) con 9 ml de tampón de copulación (MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), pH 6,7) durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron entonces 150 µl de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, 10 mg/ml en tampón de copulación, Sigma Chemical Company) a la solución de micropartículas y se mezclaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 822 µl de solución de anticuerpo monoclonal C11-14 (2,13 mg/ml) a las micropartículas activadas, se mezclaron y se voltearon durante 16 horas a temperatura ambiente. Se centrifugaron entonces las micropartículas a 12.000 X g durante 3 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las micropartículas con tampón de lavado de micropartículas (solución salina tamponada con fosfatos-PBS, Tween 20, pH 7,2), seguido de lavado con tampón de revestimiento de micropartículas (solución salina tamponada con Tris-TBS, seroalbúmina bovina-BSA, pH 7,2) y de lavado final con tampón de intercambio final de micropartículas (PBS, Tween 20, pH 7,2). Se resuspendieron las micropartículas en 5 ml de tampón de intercambio final y se estresaron por calor a 45°C durante 72 horas. Tras el estrés por calor, se añadieron 5 ml de diluyente de micropartículas (suero bovino de ternera, IgG de caballo, Tween 20, BSA, caseína, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sacarosa y proclina, pH 6,5), para tener una concentración final de aproximadamente el 1,0%.

ii. Preparación de micropartículas de mAb A5 (14-635-225) para el VHC. Se utilizó un procedimiento similar al mencionado en el Ejemplo (V) (B1) (i), excepto por el hecho de que, en lugar del mAb C11-14, se utilizó el mAb A5 (14-635-225) para la deposición sobre micropartículas.

iii. Preparación de micropartículas con C11-3 del VHC. Se añadieron 6,6 µl de HCl 1 N a 300 µl (1,45 mg/ml) de anticuerpo monoclonal C11-3 para llevar el pH a 2,5. Se incubó entonces el monoclonal a este pH durante 5 minutos. Se llevó luego el pH a 6,5 añadiendo tampón MES 50 mM. Se mezcló después una alícuota de 100 µl de micropartículas carboxiladas (10% peso/volumen, 0,227 micras, Seradyn, Indianápolis, IN) con 333 µl de tampón de copulación (MES, pH 6,7) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 15 µl de solución de EDAC (10 mg/ml en tampón de copulación) a la solución de micropartículas y se mezclaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 552 µl de solución de anticuerpo monoclonal C11-3 sometida a choque de pH (0,725 mg/ml) a las micropartículas activadas, se mezclaron y se voltearon durante 16 horas a temperatura ambiente. Se centrifugaron entonces las micropartículas a 12.000 x g durante 3 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las micropartículas con tampón de lavado de micropartículas (solución salina tamponada con fosfatos (PBS), Tween 20, pH 7,2), seguido de un lavado con tampón de revestimiento de micropartículas (solución salina tamponada con Tris (TBS), seroalbúmina bovina (BSA), pH 7,2) y de un lavado final con tampón de intercambio final de micropartículas (PBS, Tween 20, pH 7,2). Se resuspendieron las micropartículas en 0,5 ml de tampón de intercambio final y se estresaron por calor a 45°C durante 72 horas. Tras el estrés por calor, se añadieron 0,5 ml de diluyente de micropartículas (suero bovino de ternera, IgG de caballo, Tween 20, BSA, Caseína, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sacarosa y proclina, pH 6,5), para tener una concentración final de aproximadamente el 1,0%.

iv. Mezcla de micropartículas de C11-14 y C11-3 de VHC.

Se mezclaron 36 µl de micropartículas de C11-3 para el VHC (1% en sólidos) preparadas como se describe en el Ejemplo (V) (B1) (iii) y 84 µl de micropartículas de C11-14 para el VHC (1% en sólidos) preparadas como se

describe en el Ejemplo (V) (B1) (i) con 880  $\mu$ l de diluyente de micropartículas (suero bovino de ternera, IgG de caballo, Tween 20, BSA, Caseína, EDTA, sacarosa y proclina, pH 6,5).

C. Preparación de micropartículas para el ensayo combo:

Para el ensayo dual, se usaron dos canales PRISM<sup>®</sup> independientes, uno para el ensayo de anticuerpos para el VHC y uno para el ensayo de antígenos del VHC. Para el ensayo combo, se realizaron tanto el ensayo de anticuerpos como el ensayo de antígenos en un solo canal en el que se combinaban los reactivos tanto para el ensayo de antígenos como para el ensayo de anticuerpos en un kit.

i. Mezcla de micropartículas revestidas de mAb C11-14 con micropartículas revestidas de antígeno (péptido) del núcleo y micropartículas revestidas de antígeno HC33 del VHC. Se mezclaron 350  $\mu$ l de micropartículas revestidas de péptido del núcleo (stock al 1% en sólidos) preparadas como en el Ejemplo (V) (A1) (vii) y 700  $\mu$ l de micropartículas revestidas con el Ag CKS-33C-BCD de construcción *E. coli* NS3 NS4 VHC (stock al 1% en sólidos) preparadas como se describe en el Ejemplo (V) (A1) (iii) y 319  $\mu$ l de micropartículas de C11-14 para el VHC (stock al 1,0099% en sólidos) preparadas como se describe en el Ejemplo (V) (B1) (i) con 5.631  $\mu$ l de diluyente de micropartículas (suero bovino de ternera, IgG de caballo, Tween 20, BSA, caseína, EDTA, sacarosa y Proclina, pH 6,5).

D. Preparación de micropartículas para el ensayo combo utilizando micropartículas revestidas de p9MB18, micropartículas revestidas de c200 y micropartículas revestidas de C11-14:

i. Antígeno C-200 del VHC. Se obtuvo antígeno recombinante C-200 del VHC de Chiron Corporation, Emeryville, Calif. En particular, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos 1192-1932 del VHC (disponible en el GenBank, como se ha descrito aquí con anterioridad) y es de las regiones NS3 y NS4. El antígeno c200 es una proteína de fusión quimérica, con 154 aminoácidos de la superóxido dismutasa humana (hSOD).

ii. Preparación de micropartículas de c200. Se mezcló una alícuota de 100  $\mu$ l de micropartículas (10% peso/volumen, 0,7-0,9 micras, de Seradyn, Indianápolis, Ind.) con 830,6  $\mu$ l de tampón de revestimiento (tampón MES, pH 6,5, con SDS) durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron luego 69,4  $\mu$ l de solución de antígeno c200 (0,72 mg/ml) a la solución de micropartículas, se mezclaron y se voltearon durante 16 horas a temperatura ambiente. Se centrifugaron las micropartículas a 12.000 X g durante 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Se retiró la suspensión y se lavaron las micropartículas con tampón de lavado (fosfato, NaCl, EDTA, SDS, pH 6,5) y se estresaron por calor a 56°C durante 16-20 horas. Se resuspendieron luego las micropartículas en 500  $\mu$ l de diluyente de micropartículas (tampón fosfato, pH 6,5, EDTA, NaCl, sacarosa, SDS, azida) a una concentración final del 2,0%.

iii. Preparación de micropartículas de p9MB-18. Se mezcló una alícuota de 100  $\mu$ l de micropartículas (10% peso/volumen, 0,7-0,9 micras (de Seradyn, Indianápolis, Ind.)) con 788  $\mu$ l de tampón de revestimiento (tampón MES, pH 6,5, con SDS) durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron entonces 112  $\mu$ l de una solución de antígeno p9MB-18 del VHC (0,89 mg/ml) a la solución de micropartículas, se mezclaron y se voltearon durante 16 horas a temperatura ambiente. Se centrifugaron las micropartículas a 12.000 X g durante 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Se retiró la suspensión y se lavaron las micropartículas con tampón de lavado (fosfato, NaCl, EDTA, SDS, pH 6,5) y se estresaron por calor a 56°C durante 16-20 horas. Se resuspendieron luego las micropartículas en 500  $\mu$ l de diluyente de micropartículas (tampón fosfato, pH 6,5, EDTA, NaCl, sacarosa, SDS, azida) a una concentración final del 2,0%.

iv. Mezcla de micropartículas revestidas de mAb C11-14 con micropartículas revestidas de p9MB-18 del VHC y micropartículas revestidas de antígeno c200 del VHC. Se mezclaron 50  $\mu$ l de micropartículas revestidas de p9MB-18 (stock al 2% en sólidos) preparadas como en el Ejemplo (V) (D) (iii), 62,5  $\mu$ l de micropartículas revestidas de Ag c200 del VHC (stock al 2% en sólidos) preparadas como se describe en el Ejemplo (V) (D) (ii) y 125  $\mu$ l de micropartículas de C11-14 para el VHC (stock al 2% en sólidos) preparadas como se describe en el Ejemplo (V) (B1) (i) con 4.762,5  $\mu$ l de diluyente de micropartículas (EDTA, SDS, sacarosa y proclina, PBS, pH 6,5).

Sensibilidad: La sensibilidad de la seroconversión era del 95,8% en comparación con los datos de ensayos de ácidos nucleicos. El ensayo PRISM<sup>®</sup> VHC Ag/Ab Real Combo detectó 23/24 sangrías positivas como reactivas. Se resumen los datos en la Tabla V a continuación. La sensibilidad global para los paneles de seroconversión mostrados en la Tabla IV es comparable entre las micropartículas mezcladas preparadas como se describe en el Ejemplo (V) (C) (i) y las micropartículas preparadas como se describe en el Ejemplo (V) (C) (iv) utilizando el formato de ensayo proporcionado en la Figura 3. Sin embargo, para el anti-núcleo del VHC, las micropartículas revestidas de P9MB18 de la muestra específica mostraron un mejoramiento significativo con respecto al péptido específico del núcleo (11-28 aa, se hace referencia a la Tabla VI) cuando se usaron en combinación en un formato de ensayo combo (Tabla VI).

D. Preparación de micropartículas revestidas de p9MB31:

i. Se mezcló una alícuota de 100 µl de micropartículas (10% peso/volumen, 0,7-0,9 micras, de Seradyn, Indianápolis, Ind.) con 788 µl de tampón de revestimiento (tampón MES, pH 6,5, con SDS) durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron entonces 112 µl de una solución de antígeno p9MB-31 del VHC (0,89 mg/ml) a la solución de micropartículas, se mezclaron y se voltearon durante 16 horas a temperatura ambiente. Se centrifugaron las micropartículas a 12.000 X g durante 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Se retiró la suspensión y se lavaron las micropartículas con tampón de lavado (fosfato, NaCl, EDTA, SDS, pH 6,5) y se estresaron por calor a 56°C durante 16-20 horas. Se resuspendieron luego las micropartículas en 500 µl de diluyente de micropartículas (tampón fosfato, pH 6,5, EDTA, NaCl, sacarosa, SDS, azida) a una concentración final del 2,0%.

Sensibilidad: Se comparó la sensibilidad de los paneles del VHC entre micropartículas revestidas de antígeno r p9MB-18 y p9MB-31 usando el formato de ensayo proporcionado en la Figura 1. En general, la sensibilidad para estos dos antígenos r es comparable, como se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV

Panel o muestra	S/CO de uPS (V) (D) (iv) revestidas de p9MB18	S/CO de uP (V) (E) (i) revestidas de p9MB31
Panel A	13,03	9,43
NABI #2	21,9	27,76
NABI #15	28,21	33,04

El Panel A es principalmente un panel antinúcleo.  
NABI #2 es una muestra anti-NS3. NABI #15 es una muestra antinúcleo y anti-NS3.

Tabla V

Genotipo	Ag anterior a Ab en	Número de día	Resultados de las pruebas de ARN VHC	S/CO de Ab VHC	S/CO de Ag VHC	S/CO de combo real de Ab/Ag VHC
1a	38 días	0	-	0,09	0,49	0,39
		24	+	0,11	10,63	2,47
		27	+	0,10	43,77	4,66
		31	+	0,11	72,92	8,09
		62	+	5,19	44,41	5,61
		64	+	5,22	69,55	5,86
		69	+	5,91	12,92	4,22
		71	+	6,29	7,09	3,77
1b	18 días	0	+	0,09	76,61	6,21
		4	+	0,09	56,09	4,29
		7	+	0,08	39,63	2,97
		13	+	0,34	32,14	2,44
		18	+	1,53	14,93	1,68
		21	+	3,20	19,97	2,64
		164	No estudiado	5,86	0,61	3,61
1a	23 días	0	-	0,09	0,45	0,39
		2	-	0,08	0,45	0,42
		17	+	0,07	20,06	1,58
		19	+	0,09	45,84	4,11
		24	+	0,09	81,03	6,26
		26	+	0,07	63,30	5,95
		36	+	0,31	74,78	8,44
		40	+	4,03	49,53	5,74
1a	32 días	0	-	0,46	0,54	0,29
		22	-	0,42	0,53	0,43
		24	-	0,43	0,47	0,40
		42	+	0,46	8,79	0,99
		46	+	0,44	22,26	2,02
		74	+	4,22	19,82	2,40
		76	+	4,50	23,78	2,99

Tabla VI

Panel o muestra	Combo mezclado de péptidos ups (V) (C) (i) S/CO	Combo mezclado de P9MB-18 ups (V) (D) (iv) S/CO
Panel A	0,95	1,25
NABI #7	0,44	2,27
NABI 0141044662	1,15	2,04

\*Valores de S/CO  $\geq 1,00$  son considerados reactivos.  
NABI #7 y NABI 0141044662 son muestras de antinúcleo del VHC de NABI. El Panel A es principalmente un panel antinúcleo.

**Ejemplo VI**

- 5 Preparación de conjugados marcados con acridinio
- A. Conjugado para ensayo de anticuerpos:
- 10 Para el ensayo de anticuerpos, se utilizaron o bien IgG de ratón antihumana directamente marcada con acridinio, o bien un precomplejo de F(ab')<sub>2</sub> antihumano biotinilado y conjugado de antibiotina y acridinio.
- i. Precomplejo de F(ab')<sub>2</sub> antihumano biotinilado y conjugado de antibiotina y acridinio. Se preparó el anticuerpo antibiotina marcado como se describe en la Patente EE.UU. N° 5.705.330. Se preparó también el precomplejo de F(ab')<sub>2</sub> antihumano biotinilado y conjugado de antibiotina y acridinio como se describe en la Patente EE.UU. N° 5.705.330.
- 15 ii. IgG de ratón antihumana marcada con acridinio. Se añadieron 53,6  $\mu$ l de tampón de conjugación (CB) que contenía fosfato de sodio, NaCl y 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-1-propanosulfonato (CHAPS, Sigma Chemical Company, Saint Louis, Mo), pH 8,0, y 7.2  $\mu$ l de éster de N-hidroxisuccinimida de 10-(3-sulfopropil)-N-tosil-N-(2-carboxietil)-9-acridiniocarboxamida (4 mg/ml en dimetilformamida) a 131  $\mu$ l de IgG de ratón antihumana (4,59 mg/ml) y 601  $\mu$ l de PBS a temperatura ambiente. Se mezcló la mezcla de reacción con un rotador durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción cargando la mezcla de reacción en la HPLC. Se aplicó ésta a una columna de filtración en gel Bio-Sil SEC-250 de 300 x 7,8 mm (Bio-Rad, Richmond, California) que había sido equilibrada con tampón que contenía CHAPS, NaCl y fosfato de sodio, pH 6,3. Se eluyó la columna a 1,0 ml/min. con el mismo tampón usando un controlador Beckman 421A equipado con una bomba modelo 114M. Se recogieron fracciones de 1 ml y se determinó la absorbancia a 280 nm y 370 nm con un espectrofotómetro Beckman DU-7. Se calculó el grado de incorporación de acridinio como se describe en la Patente EE.UU. N° 5.705.330. La razón de acridinio a IgG (mol/mol) obtenida era de aproximadamente 2,5. Se almacenó el conjugado a 4°C.
- 20
- 25
- 30 B. Conjugado para ensayo de antígenos:
- i. Acridinilación de conjugado de C11-10. Se usó un procedimiento similar al mencionado en el Ejemplo (V) (A) (ii), excepto por los siguientes cambios. Se mezclaron 700  $\mu$ l de tampón de conjugado, 300  $\mu$ l (1 mg/ml) de mAb C11-10 y 2,9  $\mu$ l (4 mg/ml) de derivado de acridinio durante 10 minutos a temperatura ambiente. La razón de acridinio a IgG (mol/mol) obtenida era de aproximadamente 2,0. Se almacenó el conjugado a 4°C.
- 35
- C. Conjugado para ensayo combo:
- 40 Mezcla de IgG de ratón antihumana acridinilada y conjugado de mAb C11-10 acridinilado:
- Se mezclaron 14  $\mu$ l de IgG de ratón antihumana acridinilada (1  $\mu$ g/ml) con 390  $\mu$ l de conjugado de mAb C11-10 acridinilado (1,79  $\mu$ g/ml), que dieron 2 ng/ml de IgG de ratón antihumana con 100 ng/ml de C11-10, se incubaron durante 2 horas y se filtraron antes de su uso. La preparación de IgG de ratón antihumana y de conjugado de mAb C11-10 acridinilado está descrita en el Ejemplo (V) (A) (ii) y (VI) (B), respectivamente.
- 45

**Ejemplo VII**

50 Detección de proteína del núcleo del VHC por anticuerpos monoclonales

- Dado que se disponía de un gran número de anticuerpos monoclonales anti-núcleo del VHC para uso en el desarrollo de un ensayo de detección de antígenos, era necesario determinar qué combinación de anticuerpos monoclonales proporcionaría la mayor sensibilidad. Como el número de combinaciones posibles al utilizar más de un monoclonal sobre la fase sólida (es decir, para la captura) y en la fase líquida (es decir, detección) es extremadamente grande, se usó un método simplificado de "cribado" para identificar el par de monoclonales de mejor rendimiento. Se supuso que, una vez identificado el par más sensible, se podrían añadir otros monoclonales para mejorar la sensibilidad del ensayo, de ser necesario.
- 55

5 Con objeto de identificar los mejores pares, por lo tanto, se depositaron anticuerpos monoclonales sobre  
micropartículas o se conjugaron con acridinio, como se describe en los Ejemplos IV y V. Los ensayos de cribado  
utilizaban micropartículas revestidas de anticuerpos monoclonales (0,40  $\mu\text{m}$  de diámetro) a una concentración de  
trabajo del 0,09-0,15% en sólidos y monoclonales conjugados a una concentración de trabajo de 100-125 ng/ml.  
10 Para todos los experimentos, se utilizaron los mismos plasmas de control positivo y negativo (0,1 ml para cada  
ensayo). El suero de control positivo era de un individuo infectado por VHC que dio negativo para anticuerpos VHC,  
pero cuyo plasma tenía un título de ARN VHC de 19.000.000 copias por ml. El plasma de control negativo era de un  
donante de sangre normal que dio negativo para anticuerpos y ARN del VHC. Se realizaron los ensayos usando la  
instrumentación y los métodos operativos descritos en el Ejemplo IX.

15 La Tabla VII muestra los valores medios de señal-a-negativo (S/N) obtenidos al estudiar los diversos pares de  
anticuerpos monoclonales en cuanto a su capacidad para detectar antígeno del núcleo del VHC en el plasma  
humano de control positivo (nd: no determinado). Es evidente por estos datos que algunos pares de anticuerpos  
monoclonales exhiben una mayor sensibilidad que otros y que la sensibilidad dependía de la apropiada  
configuración del ensayo. Por ejemplo, cuando se usó el anticuerpo monoclonal A05 como reactivo de captura y se  
usó C11-10 como reactivo de detección, el valor S/N resultante era de 150,0; sin embargo, cuando se usó la  
configuración opuesta, el valor S/N resultante era sólo de 6,8.

Tabla VII

Detección del antígeno del núcleo del VHC en plasma humano por diversos pares de anticuerpos monoclonales antinúcleo

	CONJUGADO														
	mAb	107-35-54	14-635-225	14-726-217	13-975-157	13-959-270	14-178-125	14-886-216	110-81-17	14-945-218	C11-3	C11-7	C11-10	C11-14	C11-15
mAb	A04	A05	A06	A08	A09	A13	A14	A15	A218	C11-3	C11-7	C11-10	C11-14	C11-15	
14-1708-403	A01	0.6	nd	1.3	2.5	1.0	1.3	5.2	1.0	1.4	2.4	0.9	53.0	1.9	3.5
14-153-462	A02	nd	nd	1.4	nd	0.9	1.5	1.5	nd	2.4	0.6	1.0	22.0	1.8	0.2
14-1269-281	A03	0.8	nd	1.3	2.4	1.1	1.3	7.4	0.9	1.4	2.2	2.9	101.6	3.0	6.0
107-35-54	A04	nd	nd	0.9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.7	1.2	7.6	12.9	1.3
14-635-225	A05	1.2	nd	1.5	2.9	0.9	1.0	8.4	1.0	1.5	4.2	2.1	150.0	1.9	4.0
14-726-217	A06	nd	nd	0.6	nd	1.6	1.8	2.5	nd	2.7	1.7	2.4	9.5	3.8	0.7
13-975-157	A08	nd	nd	0.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.4	0.8	4.6	1.6	3.2
13-959-270	A09	nd	nd	1.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.5	1.2	2.4	1.5	1.0
14-1705-255	A10	nd	nd	0.7	nd	1.3	1.7	1.2	nd	2.5	1.6	1.3	13.6	4.5	1.2
14-188-104	A11	nd	nd	0.8	nd	1.0	1.2	2.8	nd	1.2	2.8	0.7	16.5	1.8	2.4
14-1287-252	A12	nd	nd	0.9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.8	1.9	6.3	2.4	6.1
14-886-216	A14	nd	nd	0.9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.2	3.1	3.0	4.2	2.1
110-81-17	A15	nd	nd	1.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.0	1.9	6.3	2.4	2.3
14-947-104	A16	0.5	nd	1.1	6.1	1.5	1.3	6.1	1.1	1.1	1.6	1.4	69.0	4.7	1.2
C11-3	C11-3	0.6	4.7	nd	nd	1.1	2.1	1.0	nd	0.9	2.0	1.1	11.1	4.6	3.6
C11-7	C11-7	1.2	3.9	nd	nd	1.1	0.8	3.6	nd	1.3	2.5	1.8	6.2	3.4	2.0
C11-10	C11-10	0.6	6.8	nd	nd	0.9	1.4	1.1	nd	1.0	8.2	1.9	4.3	4.6	2.8
C11-14	C11-14	0.8	2.0	1.5	nd	0.8	1.1	13.4	nd	1.7	7.9	0.9	208.0	2.2	14.4
C11-15	C11-15	1.6	4.6	nd	nd	1.2	1.4	1.3	nd	1.5	5.1	1.5	4.9	3.8	5.7

MICROPARTÍCULA

5 Ejemplo VIII

Tampón diluyente de muestras para ensayo de antígeno del núcleo del VHC

10 El ensayo de antígeno del núcleo del VHC para PRISM®, como se describe en el Ejemplo XI, utiliza un tampón diluyente de muestras (SDB) para la dilución de la muestra de suero o plasma humano que se ha de estudiar. Se añaden entonces las micropartículas revestidas de anticuerpo monoclonal para formar una mezcla de reacción. Es posible que la sensibilidad y la especificidad del ensayo de detección de antígenos se vean afectadas por la composición del SDB, en términos de los ingredientes y de su concentración.

Se conjeturó que, como se piensa que el VHC es un virus con envuelta, sería necesario incluir detergente (surfactante) en el SDB para eliminar la envuelta lipídica, exponiendo así la proteína del núcleo a la solución. Además, se supuso que la adición de sales caotrópicas al SDB podría ayudar a la disolución del complejo de la nucleocápside, lo que podría aumentar la capacidad de detección del antígeno del núcleo.

Para investigar los posibles efectos de la composición del SDB sobre la sensibilidad del ensayo del antígeno del núcleo del VHC, se prepararon una serie de tampones y se estudiaron en un ensayo de antígenos del núcleo del VHC constituido por micropartículas revestidas con anticuerpo monoclonal C11-7 o C11-14 (como se indica en las leyendas de las tablas) y conjugado de anticuerpo monoclonal C11-10 marcado con acridinio. El SDB más simple utilizado (al que también se hace referencia como tampón basal), en términos del número de componentes, consistía en fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,2, y EDTA 10 mM. Éste es el tampón al que se añadieron detergentes y sales. Se determinó el rendimiento de los SDB examinando su efecto sobre la razón de señal-a-negativo (S/N) obtenida al estudiar un plasma humano de control positivo de un individuo que dio negativo para anticuerpos VHC, pero cuyo plasma tenía un título de ARN VHC de 19.000.000 copias por ml. El plasma de control negativo era de un donante de sangre normal que dio negativo para anticuerpos y ARN VHC. Los ensayos de cribado utilizaron micropartículas revestidas a una concentración de trabajo del 0,09-0,15% en sólidos y conjugado C11-10 a una concentración de trabajo de 100-125 ng/ml. Para todos los experimentos, se usaron los mismos plasmas de control positivo y negativo (0,1 ml para cada ensayo). Se realizaron los ensayos usando la instrumentación y los métodos operativos descritos en el Ejemplo VIII.

Tal como se muestra en la Tabla VIII, el valor S/N obtenido varía en gran medida dependiendo del detergente añadido al tampón diluyente de muestra y su concentración. La adición del surfactante zwitteriónico SB-12 (laurilsulfobetaina) dio los valores S/N más altos. Además, como se muestra en la Tabla IX, se observaron de nuevo los valores S/N más altos con SB-12 en comparación con otros detergentes zwitteriónicos de la misma clase, pero con diferentes longitudes de las cadenas de alquilo. Se muestra la titulación de la cantidad de SB-12 añadida al tampón basal en presencia de un 0,5% o un 2% de Tritón X-100 en la Tabla X. El aumento de la concentración de SB-12 por encima del 6% disminuyó los valores S/N obtenidos en el ensayo de antígeno del núcleo significativamente.

Otros experimentos examinaron el efecto de la adición de sales o de diferentes combinaciones de detergentes zwitteriónicos o no iónicos sobre la sensibilidad del ensayo de antígeno del núcleo. Los resultados presentados en las Tablas XI y XII sugieren que se observa un efecto marginal sobre S/N cuando se substituye el NaCl por KCl; esto mismo es cierto para la adición de urea. Los tampones de diluyente de muestra que contienen SB-16 (palmitilsulfobetaina) parecen exhibir mayores valores S/N. Se examinó el efecto de la urea incluyendo concentraciones crecientes en uno de los SDB que dio valores S/N razonablemente altos en comparación con los otros en un experimento previo (Tabla XIII). En este tampón particular, la adición de urea hasta una concentración final de 2,0-2,5 M parece haber aumentado los valores S/N muy significativamente.

Se examinó también el efecto sobre los valores S/N de la adición de diversas proteínas o de suero de fuentes no humanas a un tampón diluyente de muestra (Tabla XIV). La inclusión de seroalbúmina bovina, con o sin otros componentes proteicos, sólo aumentó marginalmente los valores S/N obtenidos al estudiar el suero de control positivo al VHC. Por el contrario, algunas combinaciones de proteínas o sueros redujeron realmente el valor S/N en relación al observado para el tampón libre de proteína.

Tabla VIII

Efecto del detergente sobre la detección del antígeno del núcleo del VHC			
Detergente/aditivo (en tampón basal)	Acrónimo	S/N al 0,5%	S/N al 2%
Sulfonato de dodecildimetil-3-amoniopropano	SB.12	2,4	7,9
Cloruro de 1-dodecilmiridinio	DPC	0,1	6,9
Dodecilsulfato de sodio	SDS	2,7	5,0
Propanosulfonato de colamidopropildimetilamonio	CHAPS	1,0	4,7
Ácido 3a,7a,12a-trihidroxi-5b-colánico	Colato	1,2	2,2
t-Octilfenoxipolietoxietanol	Tritón X-100	2,0	1,8
Carboximetiltrimetilamonio	Betaina	1,9	1,5
Ácido taurocólico	TCA	1,1	1,3
Bromuro de dodeciltrimetilamonio	DTAB	0,2	1,1
Mezcla de esteroides, polisacáridos y detergentes	Saponina	3,1	0,9
N-Dodecanoil-N-metilglicina (N-lauroilsarcosina)	NLS	1,6	0,2
Bromuro de cetiltrimetilamonio	CTAB	1,6	nd
Bromuro de tetradeciltrimetilamonio	TDTAB	1,6	nd
Formato de ensayo: Micropartículas revestidas de monoclonal C11-7 anti-núcleo del VHC (0,40 µm) y conjugado C11-10.			
nd: no determinado.			

# ES 2 409 631 T3

Tabla IX

Detergente/aditivo (en tampón basal)	Acrónimo	S/N al 0,5%	S/N al 2%
3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato	CHAPSO	2,9	11,5
Butirato de N-dodecil-N,N-(dimetilamonio)	DDMAB	1,9	nd
Undecanoato de N-dodecil-N,N-(dimetilamonio)	DDMAU	4,1	9,4
N-óxido de N,N-dimetildodecilamina	LDAO	3,8	1,8
1-Propanosulfonato de N-octil-N,N-dimetil-3-amonio	SB-8	2,5	3,8
1-Propanosulfonato de N-decil-N,N-dimetil-3-amonio	SB-10	3,0	5,2
1-Propanosulfonato de N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio	SB-12	16,0	38,3
1-Propanosulfonato de N-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio	SB-14	4,5	0,8
1-Propanosulfonato de N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio	SB-16, 0,125%	5,0	nd

Ensayo de formato: Micropartículas revestidas de monoclonal antinúcleo del VHC C11-14 (0,40 µm) y conjugado de C11-10.  
nd: no determinado.

Tabla X

Detergente/aditivo (en tampón basal)	SN con 0,5% de Tritón X-100	S/N con 2% de Tritón X-100
SB-12 al 2%	13,3	14,8
SB-12 al 4%	14,3	16,6
SB-12 al 6%	10,7	15,3
SB-12 al 8%	0,8	0,91

Formato de ensayo: Micropartículas revestidas de monoclonal antinúcleo del VHC C11-14 (0,40 µm) y conjugado C11-10.

Tabla XI

Componentes del SDB y concentración final						Exp. 1	Exp. 2
NaCl	SB-12	SB-16	CTAB	Tritón X-100	Urea	S/N	S/N
(Sin adición de tampón)						3,85	nd
Agua						3,41	4,7
0,5 M						2,84	6,7
0,5 M				1,80%		32,17	34,2
0,5 M	2%					93,4	78,2
0,5 M	2%				2,5 M	106,3	82,9
0,5 M	2%		0,10%			97,1	67,4
0,5 M	2%		0,10%		2,5 M	93,9	86,3
0,5 M	2%		0,10%	1,80%		98,8	79,1
0,5 M	2%		0,10%	1,80%	2,5 M	84,8	90,5
0,5 M		2%			2,5 M	105,2	92,9
0,5 M		2%	0,10%			106,8	108,1
0,5 M		2%	0,10%		2,5 M	142,2	102,3
0,5 M		2%	0,10%	1,80%		115,1	101,6
0,5 M		2%	0,10%	1,80%	2,5 M	nd	103,0

Todos los SDB fueron preparados en tampón basal que contenía fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,2, y EDTA 10 mM.  
Ensayo de formato: Micropartículas revestidas de monoclonal antinúcleo del VHC C11-14 (0,227 µm) y conjugado C11-10.

Tabla XII

Componentes del SDB y concentración final						
KCl	SB-12	SB-16	CTAB	Tritón X-100	Urea	S/N
0,5 M	2%					48,6
0,5 M	2%				2,5 M	86,8
0,5 M	2%		0,10%			52,8
0,5 M	2%		0,10%		2,5 M	77,6
0,5 M	2%		0,10%	1,80%		83,6
0,5 M	2%		0,10%	1,80%	2,5 M	106,8
0,5 M		2%			2,5 M	122,6
0,5 M		2%	0,10%		2,5 M	136
0,5 M		2%	0,10%	1,80%		127,9
0,5 M		2%	0,10%	1,80%	2,5 M	113,7

Todos los SDB fueron preparados en tampón basal que contenía fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,2, y EDTA 10 mM. Formato de ensayo: Micropartículas revestidas de monoclonal antinúcleo del VHC C11-14 (0,227 µm) y conjugado C11-10.

Tabla XIII

Efecto de la urea sobre la sensibilidad del ensayo de antígenos								
Factor de dilución del plasma de control positivo al VHC	Valores S/N a varias concentraciones de urea							
	0,0 M	0,5 M	1,0 M	1,5 M	2,0 M	2,5 M	3,0 M	5,0 M
1:2	35,2	31,3	32,9	33,4	43,0	34,6	33,2	1,1
1:4	19,9	15,7	17,7	13,6	21,5	18,9	15,6	1,1
1:8	9,1	8,2	9,3	6,1	10,5	8,1	8,0	0,9
1:16	5,9	4,3	5,7	5,3	6,6	5,6	5,5	1,0
1:32	3,8	3,2	3,6	3,3	3,6	3,5	3,0	1,0

Se añadió urea a concentraciones finales crecientes en el siguiente tampón: fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,2, EDTA 10 mM, NaCl 0,5 M, 2,0% de SB-16, 0,10 de CTAB y 1,8% de Tritón X-100. Se diluyó el plasma de control positivo al VHC en plasma de control negativo. Formato de ensayo: Micropartículas revestidas de monoclonal antinúcleo del VHC C11-14 (0,227 µm) y conjugado C11-10.

Tabla XIV

Efecto de la proteína o del suero sobre la sensibilidad del ensayo de antígenos		
Componente(s) añadido(s) (conc. final, p/v)	S/N	S/N
	PC 1:2	PC 1:16
Sin adiciones	69,3	9,6
1% de BSA, 2% de suero de ratón	73,7	10,3
1% de BSA, 0,1% de caseína	70,5	10,7
1% de BSA	70,2	10,3
3% de suero de caballo	68,2	9,6
2% de suero de ratón	65,6	10,9
0,1% de caseína	51,7	8,1
2% de suero de ratón, 0,1% de caseína	50,9	7,9
1% de BSA, 3% de suero de caballo	50,6	8,8
0,1% de caseína, 3% de suero de caballo	40,7	6,9
2% de suero de ratón, 3% de suero de caballo	34,3	4,9

Se añadieron proteínas o sueros a tampón que contenía fosfato de potasio 100 mM, pH 7,2, EDTA 10 mM, NaCl 0,5 M, 2% de SB-16, 1,10% de CTAB, 1,8% de Tritón X-100 y urea 2,5 M. Se diluyó el plasma de control positivo (PC) a 1:2 ó 1:16 en plasma de control negativo.

## 5 Ejemplo IX

Ensayos combo para Ab VHC PRISM<sup>®</sup>, Ag VHC PRISM<sup>®</sup> y Ab/Ag VHC PRISM<sup>®</sup>

10 El ensayo de anticuerpos PRISM<sup>®</sup> está descrito en la Patente EE.UU. N° 5.705.330, aquí incorporada como referencia, y los ensayos de antígenos y anticuerpos PRISM<sup>®</sup> están descritos en Shah y Stewart, The Immunoassay Handbook, segunda edición, editado por David Wild, pp. 297-303 (2001), también aquí incorporado como referencia.

Con respecto a la presente invención, se utilizaron los siguientes procedimientos:

15 Ensayo de Ab para el VHC:

El formato de ensayo es proporcionado en la Figura 1.

5 En general, en la estación 1, se dispensaron 50 µl de control o de muestra, 50 µl de tampón diluyente de especímenes (SDB, tampón fosfato, pH 7,0, que contenía Tween 20, suero de ternera recién nacida, NaCl, superóxido dismutasa (SOD), lisado de *E. coli* y azida) y 50 µl de micropartículas revestidas de antígeno VHC (preparadas como se describe en el Ejemplo (V) (A1) (iv) anterior) en cada uno de los pocillos de incubación y se inició la temporización del ensayo. Se mezclaron éstos por difusión mutua de cada uno en el otro sin agitación externa, para formar una mezcla de reacción. En la estación 4, se transfirió la mezcla de reacción a un pocillo de  
10 detección que contenía una matriz fibrosa y se lavó dos veces con 300 µl de lavado de transferencia (TW, que contenía tampón borato, pH 7,0, con NaCl, Tween -20, glicerol y proclina 300). Después de 18 minutos de incubación a temperatura ambiente, se dispensaron 50 µl de un precomplejo de F(ab')<sub>2</sub> biotinilado/antibiotina marcado con acridinio (fragmento F(ab')<sub>2</sub> biotinilado de IgG de cabra antihumana y anticuerpo antibiotina marcado con acridinio) en la matriz del pocillo de detección en la estación 5. Se incubó el pocillo durante 23 minutos a 37°C y se lavó la matriz fibrosa que contenía la mezcla de reacción tres veces con 100 µl de FW, que contenía MES (ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico), pH 5,7, con NaCl y proclina 300, en la estación 8. En la estación 9, como en todos los ensayos descritos a continuación, se generó una señal de quimioluminiscencia (CL) por adición de una solución alcalina de peróxido de hidrógeno, y se midieron los fotones por medio de un tubo fotomultiplicador. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpo en la muestra. Se determina la presencia o ausencia de anticuerpo en la muestra comparando el número de fotones recogidos de la muestra con un valor de corte (S/CO) determinado a partir de una calibración realizada en el lote. Se expresan los resultados como S/CO (señal a corte) en la Tabla XV a continuación. Se calcula el valor de corte por la suma del producto de los recuentos medios de quimioluminiscencia del control positivo (n=4) por 0,55 veces más los recuentos medios de quimioluminiscencia del control negativo (n=4).  
25

Sensibilidad: La sensibilidad de la seroconversión era del 100% en comparación con los datos de ARN VHC proporcionados en el certificado de análisis del vendedor para los paneles de seroconversión seleccionados estudiados. En la Tabla XV se resumen los resultados.

30 Especificidad: En base a las tasas reactivas de repeticiones, la especificidad del ensayo de Ab VHC era > 99% con la población estudiada (Tabla XVII).

Ensayo de Ag de VHC:

35 El formato de ensayo es proporcionado en la Figura 2.

Par mAb C11-14/mAb C11-10:

40 En general, en la estación 1, se dispensaron 100 µl de control o de muestra, 50 µl de tampón diluyente de especímenes (SDB, fosfato de sodio, EDTA, Tritón X-100, urea y azida sódica) y 50 µl de micropartículas revestidas de mAb VHC (preparadas como se describe en el Ejemplo (V) (B1) (i)) en cada uno de los pocillos de incubación y se inició la temporización del ensayo. Se mezclaron éstos por difusión mutua de cada uno en el otro sin agitación externa, para formar una mezcla de reacción. En la estación 4, se transfirió la mezcla de reacción a un pocillo de detección que contenía una matriz fibrosa y se lavó dos veces con 300 µl de lavado de transferencia (TW) (MES, NaCl, Tritón X-100, PEG, antiespumante, proclina 300, pH 5,6) después de 18 minutos de incubación a temperatura ambiente. En la estación 5, se dispensaron 50 µl de conjugado de mAb C11-10 acrinilado (como se menciona en el Ejemplo (VI) (B)) en la matriz del pocillo de detección. Se incubaron los contenidos del pocillo durante 23 minutos y se lavó la matriz fibrosa que contenía la mezcla de reacción una vez con 200 µl de lavado final (FW) (tampón Tris con LiCl y LDS), seguido de tres veces con 100 µl de FW. Se disparó la señal CL y se midió en la estación 9. Los resultados son expresados como S/CO (señal a corte) en la Tabla XV. El valor de corte es 2,2 veces el recuento medio de quimioluminiscencia del control negativo (n=5).  
50

Sensibilidad: Se estudiaron dos grupos de paneles de seroconversión comerciales que contenían muestras seriadamente recogidas de individuos que desarrollaron anticuerpos para el VHC en la prueba prototipo de antígenos VHC PRISM® y en la prueba de anticuerpos VHC PRISM®. Para el primer grupo de muestras de seroconversión, la primera fecha de sangría disponible era negativa para el ARN VHC. En las fechas de sangría posteriores, se detectó ARN VHC para una o más fechas de sangría, seguido en todos los casos de detección de anticuerpos para el VHC. Para el segundo grupo de paneles de seroconversión, la primera fecha de sangría ya era positiva para el ARN VHC; se detectaron anticuerpos para el VHC en las fechas de sangría posteriores. Para los dos grupos, la sensibilidad de la seroconversión era del 98,5% en comparación con los datos obtenidos por las pruebas de ARN VHC. El PRISM® de Ag VHC detectó 67/68 sangrías positivas al ARN VHC como reactivas. Los datos están resumidos en la Tabla XVI. Estos datos indican que la prueba de Ag VHC detecta la infección por VHC en individuos que aún no han producido una respuesta de anticuerpos.  
60

Especificidad: En base a las tasas reactivas de repeticiones, la especificidad del ensayo de Ag VHC era > 99% con la población estudiada (Tabla XVIII).

Ensayo de Ag VHC: par mAb A5 (14-635-225)/mAb C11-10:

5 Se usó un procedimiento de ensayo similar al mencionado para C11-14/C11-10. La única diferencia era que la prueba utilizó micropartículas revestidas de mAb A5 (14-635-225) de Abbott en lugar de micropartículas revestidas de mAb C11-14.

10 Sensibilidad: Se evaluaron un total de 4 paneles de seroconversión y se comparó la sensibilidad con los datos generados utilizando el par C11-14/C11-10. Estos pares detectaron ambos el mismo número de sangrías positivas. Los datos de sensibilidad para el par A5 (14-635-225)/C11-10 están resumidos en la Tabla XVI.

15 Especificidad: En base a las tasas reactivas de repeticiones, la especificidad del ensayo de Ag VHC era del 100% con la minipoblación (n=100) estudiada (Tabla XIX).

Ensayo de Ag VHC : Par mAb C11-14 y C11-3/mAb C11-10:

20 Se usó un procedimiento de ensayo similar al mencionado para C11-14/C11-10. La única diferencia era el uso de micropartículas mezcladas de C11-14 y C11-3 (Ejemplo (IV) (B1) (iv)) en lugar de micropartículas revestidas de mAb C11-14.

25 Sensibilidad: Se valoró el rendimiento de este par comparando la razón S/N frente a paneles consistentes en plasma humano recalcificado positivo para el antígeno del núcleo del VHC (denominado "PC") y un plasma humano negativo para antígenos y anticuerpos VHC (denominado "NC") (Tabla XX). Se determinó S/N por la fórmula:

$$S/N = \text{Media de PC} / \text{Media de NC}$$

30 Se usaron los recuentos medios de quimioluminiscencia de cuatro especímenes para determinar cada media.

Ensayo combo de Ag/Ab VHC PRISM<sup>®</sup>:

35 Se evaluaron dos formatos diferentes (es decir, el ensayo combo dual y el ensayo combo real) en el ensayo de Ag/Ab VHC PRISM<sup>®</sup> como sigue:

40 Ensayo combo dual: El ensayo combo dual de Ag/Ab VHC es realizado simultáneamente en PRISM<sup>®</sup> usando dos canales diferentes. Se usan un total de seis canales en PRISM<sup>®</sup> simultáneamente para llevar a cabo varios ensayos (VIH, núcleo de HB, Ags de HB, VTLH y Ab de VHC), cinco de los cuales están actualmente en uso, mientras que un canal permanece abierto para nuevos marcadores (v.g. ensayo de Ag VHC) o puede reservarse en caso de que uno de los canales se vuelva problemático. Así, utilizando un canal para un ensayo de Ag VHC y otros cinco canales para otros cinco ensayos, no hay disponibilidad de un canal de reserva para su uso.

45 Se realizaron los ensayos de Ab VHC PRISM<sup>®</sup> y de Ag VHC PRISM<sup>®</sup> individualmente. Se combinaron los resultados de ambos ensayos para producir un solo informe final.

Ensayo combo real: Se combinaron los ensayos de Ag VHC y Ab VHC PRISM<sup>®</sup> y se realizaron como un solo ensayo en uno de los canales PRISM<sup>®</sup>.

50 Ensayo combo dual de Ag/Ab VHC PRISM<sup>®</sup>:

Sensibilidad: La sensibilidad de la seroconversión del ensayo combo dual de Ab/Ag VHC era del 98,5%. En la Tabla XV se resumen los datos.

55 Especificidad: En base a las tasas reactivas de repeticiones, la especificidad del ensayo combo dual de Ab/Ag VHC era > 99% con la población estudiada (Tabla XXI).

Ensayo combo real de Ag/Ab VHC PRISM<sup>®</sup>:

60 En la Figura 3 se proporciona el formato de ensayo. Se realizó el ensayo combo para VHC PRISM<sup>®</sup> de dos etapas como se ha mencionado con anterioridad para el ensayo de Ab o Ag de VHC con los siguientes cambios:

65 En la estación 1, se dispensaron 100 µl de control o de muestra, 50 µl de tampón diluyente de espécimen (tampón fosfato, pH 7,0, que contenía Tween 20, suero de ternera recién nacida, NaCl, Tween-20, superóxido dismutasa (SOD), lisado de *E. coli* y azida) y 50 µl de micropartículas mezcladas de antígeno y mAb de VHC (preparadas como se describe en el Ejemplo (V) (C) (i) anterior) en cada uno de los pocillos de incubación y se inició la temporización del ensayo. En la estación 4, se transfirió la mezcla de reacción a un pocillo de detección que contenía una matriz

ES 2 409 631 T3

- 5 fibrosa y se lavó dos veces con 300 µl de lavado de transferencia (MES, NaCl, Tritón X-100, PEG, antiespumante y proclina 300, pH 5,6). Después de 18 minutos de incubación a 37 grados C, se dispensaron 50 µl de conjugado mezclado de C11-10 acridinilado y IgG de ratón antihumana acridinilada (preparada como se describe en el Ejemplo (VI) (C)) en la matriz del pocillo de detección en la estación # 5. Se incubó el pocillo durante 23 minutos y se lavó la matriz fibrosa que contenía la mezcla de reacción tres veces con 100 µl de lavado final (tampón Tris con LiCl y LDS). Se disparó la señal CL y se midió en la estación 9. Se expresan los resultados como S/CO (señal a corte) en la Tabla XV a continuación. El valor de corte es 2,2 veces el recuento medio de quimioluminiscencia del control negativo (n=3).
- 10 Sensibilidad: La sensibilidad de la seroconversión era del 95,8% en comparación con los datos de la PCR. El ensayo combo real de Ag/Ab VHC PRISM<sup>®</sup> detectó 23/24 sangrías positivas como reactivas. En la Tabla XVI se resumen los datos.
- 15 Especificidad: En base a las tasas reactivas de repeticiones, la especificidad del ensayo combo real de Ag/Ab VHC era del 100% con la población estudiada (Tabla XX):

Tabla XV

Genotipo	Ag anterior al Ab en	Número de día	Resultados de las pruebas de ARN VHC	S/CO de Ab VHC	S/CO de Ag VHC	S/CO del combo dual de Ab/Ag VHC
1a	38 días	0	-	0,09	0,49	NEG.
		24	+	0,11	10,63	POS.
		27	+	0,10	43,77	POS.
		31	+	0,11	72,92	POS.
		62	+	5,19	44,41	POS.
		64	+	5,22	69,55	POS.
		69	+	5,91	12,92	POS.
		71	+	6,29	7,09	POS.
1a	20 días	0	+	0,10	107,78	POS.
		3	+	0,11	97,81	POS.
		10	+	0,15	63,52	POS.
		20	+	1,57	No estudiado	POS.
1b	18 días	0	+	0,09	76,61	POS.
		4	+	0,09	56,09	POS.
		7	+	0,08	39,63	POS.
		13	+	0,34	32,14	POS.
		18	+	1,53	14,93	POS.
		21	+	3,20	19,97	POS.
		164	No estudiado	5,86	0,61	POS.
2b	14 días	0	+	0,10	8,41	POS.
		2	+	0,40	23,62	POS.
		7	+	2,62	14,09	POS.
		9	+	3,09	16,67	POS.
		14	+	3,99	4,74	POS.
1a	42 días	0	-	0,09	0,76	NEG.
		2	-	0,08	0,47	NEG.
		7	-	0,09	0,41	NEG.
		9	-	0,09	0,40	NEG.
		15	-	0,08	0,42	NEG.
		17	-	0,08	0,49	NEG.
		22	-	0,07	0,49	NEG.
		24	-	0,08	0,45	NEG.
		29	-	0,09	0,52	NEG.
		31	-	0,08	0,51	NEG.
		36	-	0,08	0,57	NEG.
		38	-	0,09	0,51	NEG.
		43	-	0,08	0,52	NEG.
		45	-	0,09	0,43	NEG.
		50	-	0,09	0,69	NEG.
		52	-	0,08	0,52	NEG.
57	-	0,09	0,49	NEG.		
64	-	0,09	0,90	NEG.		
67	-	0,08	0,52	NEG.		

ES 2 409 631 T3

		74	-	0,09	0,51	NEG.
		79	-	0,08	0,52	NEG.
		84	-	0,09	0,40	NEG.
		105	-	0,09	0,45	NEG.
		108	-	0,08	0,66	NEG.
		112	-	0,09	0,57	NEG.
		119	-	0,09	0,45	NEG.
		121	-	0,09	0,42	NEG.
		140	+	0,12	10,65	POS.
		143	+	0,09	3,81	POS.
		147	+	0,10	9,30	POS.
		150	+	0,09	34,08	POS.
		154	+	0,09	58,01	POS.
		157	+	0,09	80,90	POS.
		161	+	0,08	107,11	POS.
		164	+	0,09	114,41	POS.
		168	+	0,09	93,29	POS.
		171	+	0,10	89,06	POS.
		182	+	1,83	63,62	POS.
		186	+	4,39	68,72	POS.
		189	+	5,20	119,62	POS.
1a	21 días	0	+	0,08	63,86	POS.
		4	+	0,07	50,76	POS.
		17	+	0,09	73,66	POS.
		21	+	1,02	45,58	POS.
		25	+	4,03	60,94	POS.
		29	+	5,08	47,38	POS.
1a	37 días	0	+	0,08	33,66	POS.
		2	+	0,06	30,83	POS.
		7	+	0,08	30,10	POS.
		9	+	0,07	39,66	POS.
		26	+	0,07	25,51	POS.
		32	+	0,12	15,29	POS.
		37	+	2,43	15,51	POS.
		41	+	3,36	3,10	POS.
1a	28 días	0	+	0,09	67,75	POS.
		2	+	0,09	87,93	POS.
		10	+	0,10	36,53	POS.
		12	+	0,10	60,67	POS.
		19	+	0,10	39,62	POS.
		21	+	0,11	26,25	POS.
		28	+	2,78	9,94	POS.
		30	+	4,00	17,02	POS.
		35	+	4,71	15,26	POS.
		37	No estudiado	4,84	13,02	POS.
1a	25 días	0	+	0,15	4,73	POS.
		2	+	0,40	6,63	POS.
		8	+	0,16	7,48	POS.
		10	+	0,11	5,20	POS.
		16	+	0,17	7,60	POS.
		18	+	0,11	7,58	POS.
		23	+	0,64	8,66	POS.
		25	+	2,11	9,58	POS.
		30	+	2,76	6,21	POS.
		32	+	3,39	7,84	POS.
		49	+	6,12	1,83	POS.
		53	+	6,13	1,93	POS.
		56	+	6,34	1,63	POS.
1a	28 días	0	-	0,13	1,27	POS.
		2	-	0,23	0,52	NEG.
		8	-	0,09	0,50	NEG.
		11	+	0,10	0,54	NEG.
		15	+	0,10	1,92	POS.
		18	+	0,11	1,90	POS.
		28	+	0,12	2,42	POS.

ES 2 409 631 T3

		30	+	0,10	7,04	POS.
		35	+	0,14	6,01	POS.
		37	+	0,98	13,68	POS.
		43	+	4,74	10,07	POS.
		46	+	5,27	4,91	POS.
1a	13 días	0	+	0,10	1,82	POS.
		3	+	0,10	1,72	POS.
		5	+	0,15	1,35	POS.
		11	+	0,97	1,70	POS.
		13	+	1,26	3,63	POS.
		19	-	3,70	2,94	POS.
		25	-	4,89	2,43	POS.
		27	-	5,20	1,61	POS.
		32	-	5,61	1,35	POS.
		35	-	5,86	1,30	POS.
		41	-	6,11	0,88	POS.
		45	-	5,69	0,67	POS.
		48	-	5,95	1,94	POS.
1a	23 días	0	-	0,09	0,45	NEG.
		2	-	0,08	0,45	NEG.
		17	+	0,07	20,06	POS.
		19	+	0,09	45,84	POS.
		24	+	0,09	81,03	POS.
		26	+	0,07	63,30	POS.
		36	+	0,31	74,78	POS.
		40	+	4,03	49,53	POS.
1a	33 días	0	-	0,09	0,54	NEG.
		3	-	0,08	0,50	NEG.
		7	-	0,08	0,58	NEG.
		12	-	0,09	0,54	NEG.
		14	-	0,09	0,56	NEG.
		19	-	0,10	0,53	NEG.
		25	-	0,10	0,51	NEG.
		28	-	0,09	0,50	NEG.
		32	-	0,09	0,50	NEG.
		35	-	0,10	0,35	NEG.
		39	-	0,09	0,53	NEG.
		45	+	0,10	9,43	POS.
		47	+	0,11	42,00	POS.
		52	+	0,11	28,05	POS.
		56	+	0,11	25,63	POS.
		60	+	0,09	78,15	POS.
		73	+	0,18	9,54	POS.
		78	+	1,83	5,34	POS.
		80	+	2,13	3,40	POS.
1a	32 días	0	-	0,46	0,54	NEG.
		22	-	0,42	0,53	NEG.
		24	-	0,43	0,47	NEG.
		42	+	0,46	8,79	POS.
		46	+	0,44	22,26	POS.
		74	+	4,22	19,82	POS.
		76	+	4,50	23,78	POS.
3a	141 días	0	+	0,12	2,81	POS.
		4	+	0,49	1,95	POS.
		11	+	2,48	1,41	POS.
		13	+	2,54	1,41	POS.
		44	+	4,29	0,43	POS.
		46	+	4,68	0,43	POS.
1a	38 días	0	-	0,09	0,49	0,38
		24	+	0,11	10,63	1,60
		27	+	0,10	43,77	5,32
		31	+	0,11	72,92	11,04
		62	+	5,19	44,41	10,95
		64	+	5,22	69,55	10,16
		69	+	5,91	12,92	4,51

ES 2 409 631 T3

		71	+	6,29	7,09	3,68
1b	18 días	0	+	0,09	76,61	14,09
		4	+	0,09	56,09	5,59
		7	+	0,08	39,63	4,75
		13	+	0,34	32,14	3,81
		18	+	1,53	14,93	4,16
		21	+	3,20	19,97	3,81
		164	No estudiado	5,86	0,61	2,72
1a	23 días	0	-	0,09	0,45	0,31
		2	-	0,08	0,45	0,48
		17	+	0,07	20,06	1,36
		19	+	0,09	45,84	2,72
		24	+	0,09	81,03	4,57
		26	+	0,07	63,30	4,15
		36	+	0,31	74,78	6,90
		40	+	4,03	49,53	5,11
1a	32 días	0	-	0,46	0,54	0,48
		22	-	0,42	0,53	0,31
		24	-	0,43	0,47	0,32
		42	+	0,46	8,79	0,99
		46	+	0,44	22,26	2,11
		74	+	4,22	19,82	3,99
		76	+	4,50	23,78	3,27

\*Valores de S/CO  $\geq$  1,00 son considerados reactivos.

Tabla XVI

Genotipo	Ag anterior al Ab en	Número de día	Resultados de las pruebas de ARN VHC	S/CO de Ab VHC	S/CO de c11-14/c11-10 para el Ag VHC	A5/c11-10 para el Ag VHC	S/CO del combo dual de Ab/Ag VHC
1a	38 días	0	-	0,09	0,49	0,53	NEG.
		24	+	0,11	10,63	6,47	POS.
		27	+	0,10	43,77	29,30	POS.
		31	+	0,11	72,92	64,97	POS.
		62	+	5,19	44,41	37,22	POS.
		64	+	5,22	69,55	39,55	POS.
		69	+	5,91	12,92	7,54	POS.
		71	+	6,29	7,09	4,42	POS.
1b	18 días	0	+	0,09	76,61	68,95	POS.
		4	+	0,09	56,09	48,69	POS.
		7	+	0,08	39,63	57,02	POS.
		13	+	0,34	32,14	34,85	POS.
		18	+	1,53	14,93	16,61	POS.
		21	+	3,20	19,97	13,78	POS.
		164	No estudiado	5,86	0,61	0,62	NEG.
		1a	23 días	0	-	0,09	0,45
2	-			0,08	0,45	0,43	NEG.
17	+			0,07	20,06	7,77	POS.
19	+			0,09	45,84	17,28	POS.
24	+			0,09	81,03	30,76	POS.
26	+			0,07	63,30	27,95	POS.
36	+			0,31	74,78	36,66	POS.
40	+			4,03	49,53	21,78	POS.
1a	32 días	0	-	0,46	0,54	0,45	NEG.
		22	-	0,42	0,53	0,47	NEG.
		24	-	0,43	0,47	0,53	NEG.
		42	+	0,46	8,79	5,04	POS.
		46	+	0,44	22,26	14,18	POS.
		74	+	4,22	19,82	14,15	POS.
		76	+	4,50	23,78	8,54	POS.

\*Valores de S/CO  $\geq$  1,00 son considerados reactivos.

Tabla XVII

N estudiado	989*
RR	9
RRR	0,91
N negativo	980
S/CO medio pob. neg.	0,12
SD	0,09
SD a CO	9,76

Tabla XVIII

N estudiado	989*
RR	1
RRR	0,10
N negativo	988
S/CO medio pob. neg.	0,44
SD	0,08
SD a CO	7,15
*Donantes de sangre voluntarios.	

Tabla XIX

N estudiado	100*
RR	0
RRR	0,00
N negativo	100
S/CO medio pob. neg.	0,56
	0,15
SD a CO	2,98
*Donante de sangre voluntarios.	

Tabla XX

Conjugado de C11-10:			
Panel	Sólo micropartícula de C11-14	Sólo micropartícula de C11-3	Micropartícula mezclada de C11-14 + C11-3
S/N PC	213,7	87,8	179,4
Recuentos NC	78,8	90	93,25

Tabla XXI

N estudiado	989*
RR	9
RRR	0,91
N negativo	980
S/CO medio pob. neg.	0,12
SD	0,09
SD a CO	9,76

Tabla XXII

N estudiado	92*
RR	0
RRR	0
N negativo	92
S/CO medio pob. neg.	0,49
SD	0,15
SD a CO	3,4
*Donantes de sangre voluntarios.	

**Ejemplo X**

Unión de anticuerpos monoclonales a tres péptidos

5 Se sintetizaron tres nuevos péptidos, dos de los cuales son compatibles con un formato combo de Ab/Ag VHC y uno adecuado para uso como control. Se sintetizó cada péptido con una biotina N-terminal para facilidad de rastreo durante la preparación de la fase sólida. El péptido de aa 10-53 (ALAM-17) (KTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTS) (SEC. ID. N° 42) contiene los aminoácidos del núcleo del VHC 10-53 sin deleciones intermedias. El péptido de aa 10-53<sup>32-50</sup> (ALAM-18) (KTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVKTS) (SEC. ID. N° 43) contiene los aminoácidos del núcleo del VHC 10-53 con una deleción del 19 aminoácidos que abarca los aa 32-50. El péptido aa 10-53<sup>31-33</sup><sup>47-48</sup> (ALAM-16) (KTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVYLLPRRGPRLGVTRKTS) (SEC. ID. N° 41). Los péptidos ALAM-16 y ALAM-18 son ambos compatibles con un formato combo de Ab/Ag VHC. En el caso de ALAM-16, la deleción de los aminoácidos 31-33 evita que el monoclonal c11-10 (epitopo 32-36) se una al antígeno, y la deleción de los aminoácidos 47 y 48 evita la unión del monoclonal c11-14 (epitopo 45-50). ALAM-18 contiene una deleción que abarca las regiones de unión tanto a c11-10 como a c11-14. En la siguiente tabla se muestran datos que demuestran la falta de unión a ALAM-16 y ALAM-18 por los monoclonales c11-10 y c11-14:

Tabla XXIII

20

Monoclonal	Epitopo (aa)	S/N del péptido ALAM-17 de aa 10-53	S/N del péptido ALAM-18 de aa 10-53 <sup>32-50</sup>	S/N del péptido ALAM-16 de aa 10-53 <sup>31-33</sup> <sup>47-48</sup>
C11-15	19-27	>125,0	>200,0	>153,8
C11-10	32-36	>125,0	0,9	0,4
C11-14	45-50	>125,0	0,4	0,4
C11-3	104-110	1,0	0,4	0,4
C11-7	112-124	0,9	0,5	0,4

\*Todos los monoclonales fueron utilizados a una concentración de 1 µg/ml.

25 Además, se estudiaron 254 especímenes seropositivos de genotipo VHC, que representaban los genotipos 1, 2, 3, 4 y 6 del VHC, mediante el péptido de 10-53<sup>31-33</sup><sup>47-48</sup> (ALAM-16) para determinar la viabilidad de este péptido como diana antigénica en un formato de ensayo de Ab/Ag VHC. Los 254 (100%) especímenes eran todos reactivos hacia este péptido. Así, las deleciones presentes en este péptido, que sirven para eliminar la unión por los monoclonales necesarios para la detección de Ag, no tienen un impacto negativo sobre la reactividad de los anticuerpos hacia el resto de los epitopos del núcleo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar simultáneamente la presencia de al menos un antígeno del núcleo del VHC y al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC en una muestra de ensayo, consistente en las siguientes etapas:

(a) poner en contacto dicha muestra de ensayo con:

(1) al menos un antígeno del núcleo vírico del VHC depositado sobre una fase sólida, durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno, donde dicho antígeno del núcleo vírico del VHC es una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEC. ID. Nº 6 y sustituciones conservadoras de aminoácidos de la misma, y

(2) al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC depositado sobre dicha fase sólida, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno/anticuerpo, donde dicho al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC depositado sobre dicha fase sólida es C11-14;

(b) añadir un conjugado a los complejos anticuerpo/antígeno resultantes de (a) (1) durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes como para permitir que dicho conjugado se una al anticuerpo unido de (a) (1), donde dicho conjugado incluye un segundo anticuerpo unido a un compuesto quimioluminiscente capaz de generar una señal detectable, y añadir simultáneamente un segundo conjugado a los complejos antígeno/anticuerpo resultantes de (a) (2) durante un tiempo y bajo unas condiciones que permitan que dicho conjugado se una al antígeno del núcleo unido de (a) (2), donde dicho segundo conjugado incluye un tercer anticuerpo unido a dicho compuesto quimioluminiscente capaz de generar una señal detectable, donde dicho tercer anticuerpo es C11-10; y

(c) detectar dicha señal generada, indicando la presencia de dicha señal la presencia de dicho al menos un antígeno del núcleo del VHC, de dicho al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC o de ambos en dicha muestra de ensayo.

2. El método de la reivindicación 1, donde dicho al menos un anticuerpo monoclonal antinúcleo depositado sobre la fase sólida no es reactivo con dicho al menos un antígeno del núcleo depositado sobre la fase sólida.

3. El método de la reivindicación 1, donde dicha fase sólida es una micropartícula.

4. Un kit consistente en: a) un recipiente que contiene al menos un antígeno del núcleo del VHC depositado sobre una fase sólida, donde dicho antígeno del núcleo vírico del VHC es una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en la SEC. ID. Nº 6 y sustituciones conservadoras de aminoácidos de la misma, y b) un recipiente que contiene al menos un anticuerpo anti-núcleo del VHC depositado sobre una fase sólida, donde dicho al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC, depositado sobre dicha fase sólida es C11-14, y donde dicho kit incluye además al menos un conjugado que incluye un compuesto generador de señal unido a un segundo anticuerpo, donde dicho segundo anticuerpo es C11-10.

5. Un kit consistente en un recipiente que contiene: 1) al menos un antígeno del núcleo del VHC depositado sobre una fase sólida, donde dicho antígeno del núcleo vírico del VHC es una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en la SEC. ID. Nº 6 y sustituciones conservadoras de aminoácidos de la misma, y 2) al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC depositado sobre dicha fase sólida, donde dicho al menos un anticuerpo antinúcleo del VHC, depositado sobre dicha fase sólida, es C11-14, y donde dicho kit incluye además al menos un conjugado que incluye un compuesto generador de señal unido a un segundo anticuerpo, donde dicho segundo anticuerpo es C11-10.

6. El kit de la reivindicación 4 ó 5, donde dicho compuesto generador de señal es acridinio.

7. Una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en la SEC. ID. Nº 6 y sustituciones conservadoras de aminoácidos de la misma.

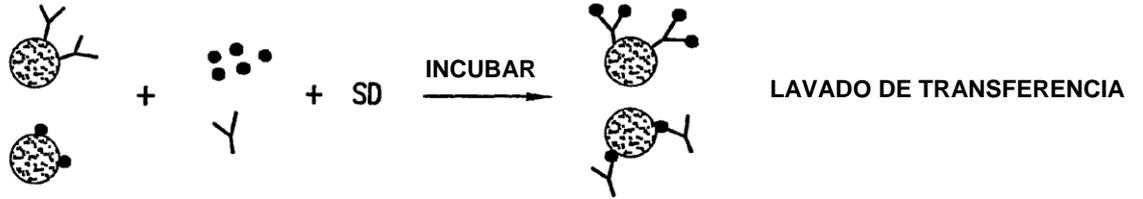
8. Una proteína recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. Nº 5.

9. Un vector o construcción que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. Nº 5.

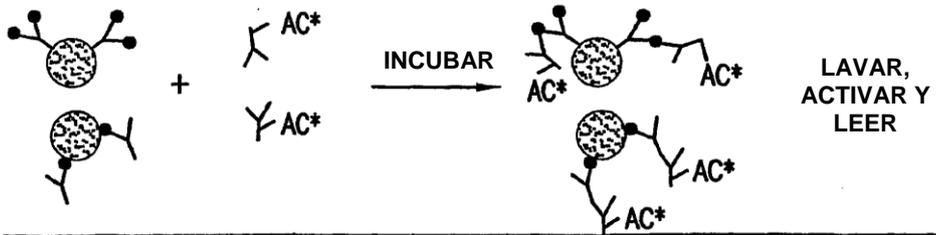
10. Una célula huésped que contiene dicho vector o construcción de la reivindicación 9.

UN FORMATO DE ENSAYO COMBO PROTOTIPO DE  
Ag/Ab VHC PRISM™ DE ABBOTT

ETAPA 1



ETAPA 2



- |                                                                                     |                                                                 |                                                                                     |                             |                                                                                      |                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|  | MICROPARTÍCULAS DE ANTI-CUERPOS MONOCLONALES ANTINÚCLEO DEL VHC |  | ANTÍGENO DEL NÚCLEO DEL VHC |  | ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTINÚCLEO DEL VHC ACRIDINILADOS    |
|  | MICROPARTÍCULAS REVESTIDAS DE $\gamma$ -Ag Y PÉPTIDO            |  | ANTICUERPO Ab PARA VHC      |  | IgG DE RATÓN ANTIHUMANA (mAb de ratón) MARCADA CON ACRIDINIO |
|  | DILUYENTE DE ESPÉCIMEN                                          |                                                                                     |                             |                                                                                      |                                                              |

FIG.1

FORMATO DE ENSAYO PARA ANTÍGENO DEL NÚCLEO DEL VHC PRISM

ETAPA 1

ETAPA 2

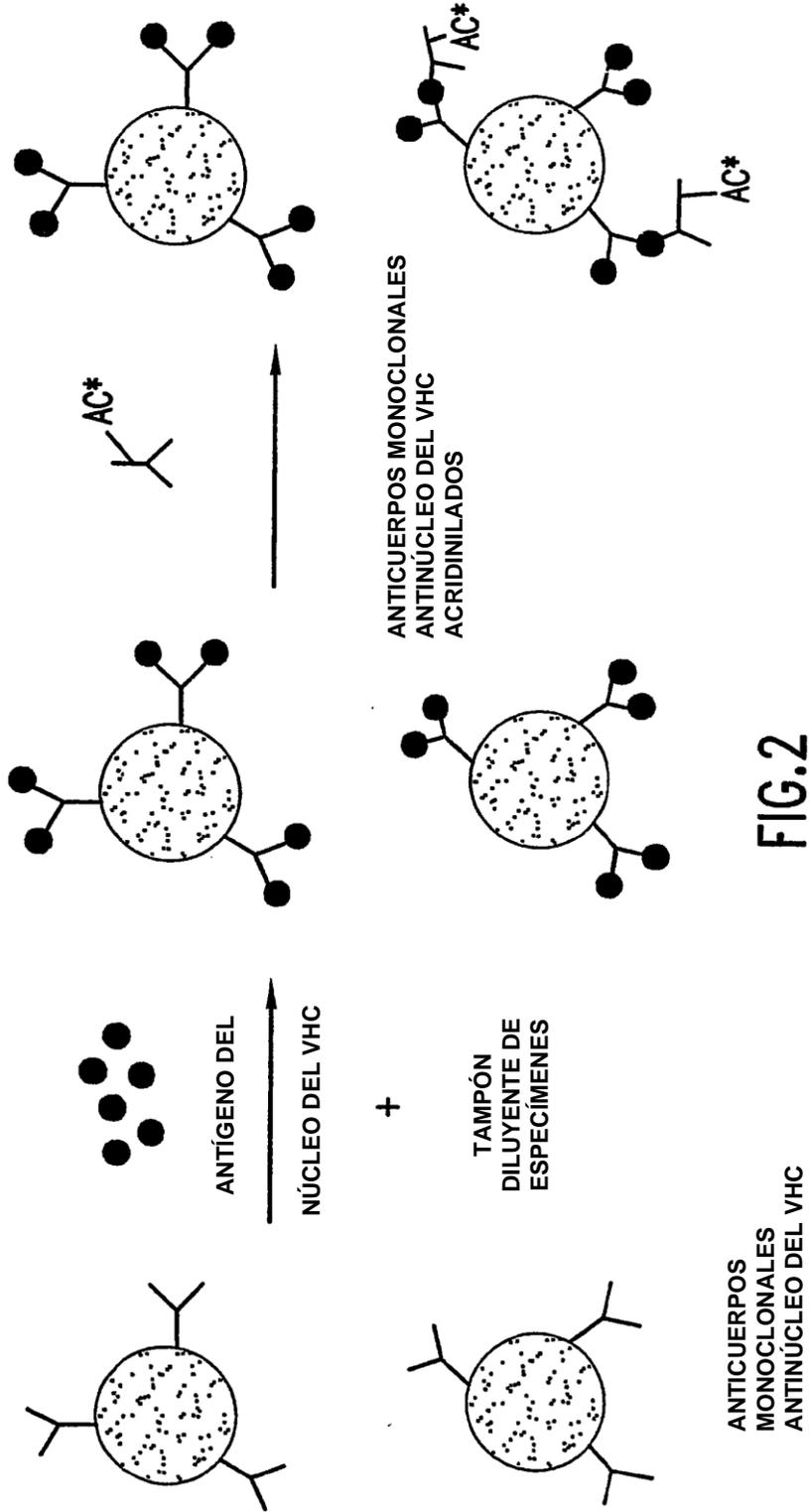


FIG.2

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTINÚCLEO DEL VHC

FORMATO DE ENSAYO PARA VHC  
PRISM™ DE ABBOTT

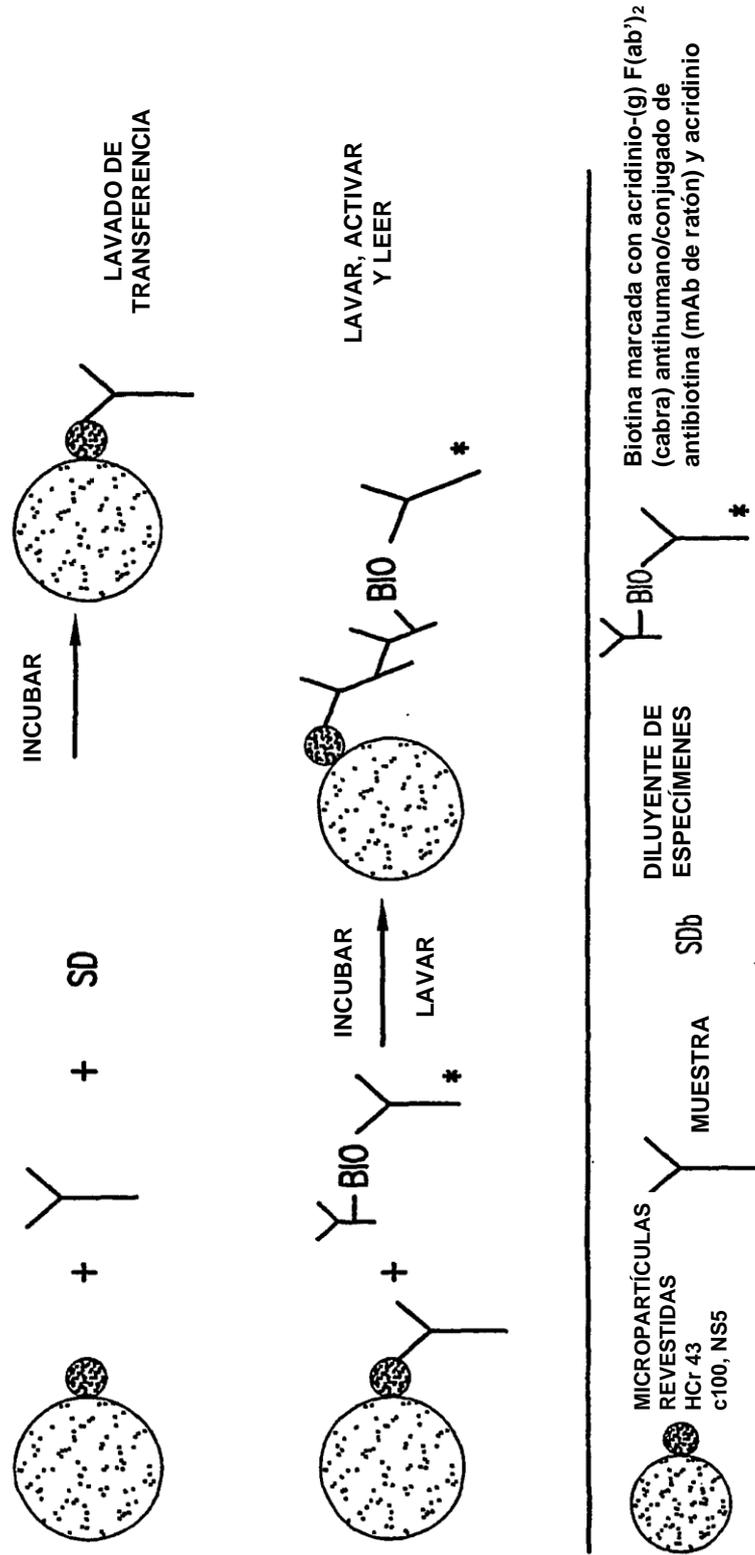


FIG.3

FIGURA 4

SEC. ID. Nº 1

ATAGAATTCC ATGCAGAAAA AAAACAAACG TAACACCAAC

SEC. ID. Nº 2

CGGCTGAGAA CGTTCAGAGG TTTTAACGAT CTGACCACCA CCCGGG

SEC. ID. Nº 3

AAAACCTCTG AACGTTCTCA GCCG

SEC. ID. Nº 4

TATGGATCCT TATTACGGAG ACAGCAGCCA ACCAGC

SEC. ID. Nº 5

GAATTCCATG CAGAAAAAAA ACAAACGTAA CACCAACCGT CGTCCGCAGG ACGTTAAATT  
CCCGGGTGGT GGTCAGATCG TTTAAACCTC TGAACGTTCT CAGCCGCGTG GGCCTCGTCA  
GCCGATCCCG AAAGCTCGTC GTCCGGAAGG TCGTACCTGG GCTCAGCCGG GTTACCCGTG  
GCCGCTGTAC GGTAACGAAG GTTGCGGTTG GGCAGGTTGG CTGCTGTCTC CGTAATAAGG  
ATCC

SEC. ID. Nº 6

MQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEG  
CGWAGWLLSP

SEC. ID. Nº 7

GAATTCCATG CAGAAAAAAA ACAAACGTAA CACCAACCGT CGTCCGCAGG ACGTTAAATT  
CCCGGGTGGT GGTCAGATCG TTGGTCTGCT GCCGCGTCGT GGTCCGCGTC TGGTCTGTAA  
AACCTCTGAA CGTTCTCAGC CGCGTGGGCG TCGTACCCG ATCCCGAAAG CTCGTCGTCC  
GGAAGGTCGT ACCTGGGCTC AGCCGGGTTA CCCGTGGCCG CTGTACGGTA ACGAAGGTTG  
CGGTTGGGCT GGTTGGCTGC TGTCTCCGTA ATAAGGATCC

SEC. ID. Nº 8

MQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGLLPRRGPRGRKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRTWAQ  
PGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSP

SEC. ID. Nº 9

ACCCAGACGC GGACCACGAC GCGGCAGCAG ACCAACGATC TGACCACCAC CC

SEC. ID. Nº 10

CCGCGTCGTG TCCGCGTCTG GGTCGTAAAA CCTCTGAACG TTCTCAG

SEC. ID. Nº 11

GAATTCCATG CAGAAAAAAA ACAAAACGTAA CACCAACCGT CGTCCGCAGG ACGTTAAATT  
CCCGGGTGGT GGTCAGATCG TTGGTGGTGT TTACGTTCTG CCGCGTCGTG GTCCGCGTCT  
GGGTGTTCTG GCTACGCGTA AAACCTCTGA ACGTTCTCAG CCGCGTGGGC GTCGTCAGCC  
GATCCCGAAA GCTCGTCGTC CGGAAGGTCG TACCTGGGCT CAGCCGGGTT ACCCGTGGCC  
GCTGTACGGT AACGAAGGTT GCGGTTGGGC TGTTGGCTG CTGTCTCCGT AATAAGGATC  
C

SEC. ID. Nº 12

MQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYVLPRRGPRLGVLATRKTSESRQPRRRQPIPKARRP  
EGRTWAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSP

SEC. ID. Nº 13

ACCCAGACGC GGACCACGAC GCGGCAGAAC GTAAACACCA CCAAC

SEC. ID. Nº 14

CCGCGTCGTG GTCCGCGTCT GGGTGTCTG GCTACGCGTA AAACC

SEC. ID. Nº 15

GAATTCCATG CAGAAAAAAA ACAAAACGTAA CACCAACCGT CGTCCGCAGG ACGTTAAATT  
CCCGGGTGGT GGTCAGATCG TTGGTGGTGT TTACCTGCTN CCGCGTCGTG GTCCGCGTCT  
GGGTGTTCTG GCTACGCGTA AAACCTCTGA ACGTTCTCAG CCGCGTGGGC GTCGTCAGCC  
GATCCGAAAG CTCGTCGTCC GGAAGGTCG ACCTGGGCTC AGCCGGGTTA CCCGTGGCCG  
CTGTACGGTA ACGAAGGTTG CGGTTGGGCT GGTGGCTGC TGTCTCCGTA ATAAGGATCC

SEC. ID. Nº 16

MQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSESRQPRRRQPIPKARRP  
EGRTWAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSP

SEC. ID. Nº 17

GAATTCCATG GCTGTTGACT TTATCCCGGT TGAAAATCTC GAGACTACTA TGC GTTCTCC  
GGTTTTCACT GACAACCTCTT CTCCGCCCGT TGTTCCGCAG TCTTTCCAGG TTGCTCACCT  
GCATGCTCCG ACTGGTTCTG GTAAATCTAC TAAAGTTCCA GCTGCTTACG CTGCTCAGGG  
TTACAAAGTT CTGGTTCTGA ACCCGTCTGT TGCTGCTACT CTGGGTTTCG GCGCTACAT  
GTCTAAAGCT CACGGTATCG ACCCGAACAT TCGTACTGGT GTACGTAATA TCACTACTGG  
TTCTCCGATC ACTTACTCTA CTTACGGTAA ATTCTGGCT GACGGTGGTT GCTCTGGTGG  
TGCTTACGAT ATCATCATCT GCGACGAATG CCACTCTACT GACGCTACTT CTATCCTGGG  
TATCGGTACC GTTCTGGACC AGGCTGAAAC TGCAGGTGCT CGTCTGGTTG TTCTGGCTAC  
TGCTACTCCG CCGGGTTCTG TTACTGTTCC GCACCCGAAC ATCGAAGAAG TTGCTCTGTC  
GACTACTGGT GAAATCCCGT TCTACGGTAA AGCTATCCCG CTCGAGGTTA TCAAAGGTGG  
TCGTCACCTG ATTTTCTGCC ACTCTAAAAA AAAATGCGAC GAACTGGCTG CTAAGCTTGT  
TGCTCTGGGT ATCAACGCTG TTGCTTACTA CCGTGGTCTG GACGTTTCTG TTATCCCGAC  
TTCTGGTGAC GTTGTGTGTTG TGGCCACTGA CGCTCTGATG ACTGGTTACA CTGGTGACTT  
CGACTCTGTT ATCGATTGCA ACACTTGCAA TTCCATGTCT ACCAACCCGA AACCGCAGAA  
AAAAAACAAA CGTAACACCA ACCGTCGTCC GCAGGACGTT AAATCCCGG GTGGTGGTCA  
GATCGTTAAA ACCTCTGAAC GTTCTCAGCC GCGTGGGCGT CGTCAGCCGA TCCCGAAAGC  
TCGTCGTCCG GAAGGTCGTA CCTGGGCTCA GCCGGGTTAC CCGTGGCCGC TGTACGGTAA  
CGAAGGTTGC GGTGGGCTG GTTGGCTGCT GTCTCCGTAA TAAGGATCC

**SEC. ID. Nº 18**

MAVDFI PVENLETTMRS PVFTDNSSPPVVPQS FQVAHLHAPTGS GKSTKVPAAAYAAQGYKVLVLN  
PSVAATLGF GAYMSKAHGIDENIRTVRTITGSPITYSTYGKFLADGGCSGGAYDIIICDECHS  
TDATSILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEIPFYGKAI PLEVI  
KGGRHLIFCHSKKKCDELAAKLVALGINAVAYRGLDVSVIPTSGDVVVVATDALMTGYTGDFDS  
VIDCNTCNSMSTNPKPKQKKNKRNTRRRPQDVKFPGGGQIVKTSERSQPRRRQPI PKARRPEGRT  
WAQPGYPWPPLYGNEGCGWAGWLLSP

**SEC. ID. Nº 19**

GAATTCCATG GCTGTTGACT TTATCCCGGT TGAAAATCTC GAGACTACTA TGC GTTCTCC  
GGTTTTCACT GACAACCTCTT CTCCGCCCGT TGTTCCGCAG TCTTTCCAGG TTGCTCACCT  
GCATGCTCCG ACTGGTTCTG GTAAATCTAC TAAAGTTCCA GCTGCTTACG CTGCTCAGGG  
TTACAAAGTT CTGGTTCTGA ACCCGTCTGT TGCTGCTACT CTGGGTTTCG GCGCTACAT  
GTCTAAAGCT CACGGTATCG ACCCGAACAT TCGTACTGGT GTACGTAATA TCACTACTGG  
TTCTCCGATC ACTTACTCTA CTTACGGTAA ATTCTGGCT GACGGTGGTT GCTCTGGTGG  
TGCTTACGAT ATCATCATCT GCGACGAATG CCACTCTACT GACGCTACTT CTATCCTGGG  
TATCGGTACC GTTCTGGACC AGGCTGAAAC TGCAGGTGCT CGTCTGGTTG TTCTGGCTAC  
TGCTACTCCG CCGGGTTCTG TTACTGTTCC GCACCCGAAC ATCGAAGAAG TTGCTCTGTC  
GACTACTGGT GAAATCCCGT TCTACGGTAA AGCTATCCCG CTCGAGGTTA TCAAAGGTGG  
TCGTCACCTG ATTTTCTGCC ACTCTAAAAA AAAATGCGAC GAACTGGCTG CTAAGCTTGT  
TGCTCTGGGT ATCAACGCTG TTGCTTACTA CCGTGGTCTG GACGTTTCTG TTATCCCGAC  
TTCTGGTGAC GTTGTGTGTTG TGGCCACTGA CGCTCTGATG ACTGGTTACA CTGGTGACTT  
CGACTCTGTT ATCGATTGCA ACACTTGCAA TTCCATGCAG AAAAAAAAAA AACGTAACAC  
CAACCGTCGT CCGCAGGACG TTAAATTCCC GGGTGGTGGT CAGATCGTTA AAACCTCTGA  
ACGTTCTCAG CCGCGTGGGC GTCGTCAGCC GATCCCGAAA GCTCGTCGTC CCGAAGGTCG  
TACCTGGGCT CAGCCGGGTT ACCCGTGGCC GCTGTACGGT AACGAAGGTT GCGGTTGGGC  
TGTTGGCTG CTGTCTCCGT AATAAGGATC C

**SEC. ID. Nº 20**

MAVDFI PVENLETTMRS PVFTDNSS PPVVPQS FQVAHLHAPTGS GKSTKVPAAAYAAQGYKVLVLN  
 PSVAATLGFAYMSKAHGIDPNIRTVRTITGSPITYSTY GKFLADGGCSGGAYDIIICDECHS  
 TDATSILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEI PFYKAI PLEVI  
 KGGRHLI FCHSKKKCDELA AKLVALGINAVAYYRGLDVSVI PTSGDVVVVATDALMTGYTGDFDS  
 VIDCNTCNMQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVKTSERSQPRGRRQPI PKARRPEGRTWAQPGY  
 PWPLYGNEGCGWAGWLLSP

SEC. ID. Nº 21

TATAGAATTC CATGGCTGTT GACTTTATCC

SEC. ID. Nº 22

GGAATTGCAA GTGTTGCAAT CGATAAC

SEC. ID. Nº 23

GTTATCGATT GCAACACTTG CAATTCCATG CAGAAAAAAA ACAACGTAA C

SEC. ID. Nº 24

GAATTCATG GCTGTTGACT TTATCCCGGT TGAAAATCTC GAGACTACTA TGC GTTCTCC  
 GGTTTTCACT GACAACCTCT CTCCGCCGGT TGTTCCGCAG TCTTTCCAGG TTGCTCACCT  
 GCATGCTCCG ACTGGTTCTG GTAAATCTAC TAAAGTCCA GCTGCTTACG CTGCTCAGGG  
 TTACAAAGTT CTGGTTCTGA ACCCGTCTGT TGCTGCTACT CTGGGTTTCG GCGCCTACAT  
 GTCTAAAGCT CACGGTATCG ACCCGAACAT TCGTACTGGT GTACGTAATA TCACTACTGG  
 TTCTCCGATC ACTTACTCTA CTTACGGTAA ATTCCTGGCT GACGGTGGTT GCTCTGGTGG  
 TGCTTACGAT ATCATCATCT GCGACGAATG CCACTCTACT GACGCTACTT CTATCCTGGG  
 TATCGGTACC GTTCTGGACC AGGCTGAAAC TGCAGGTGCT CGTCTGGTTG TTCTGGCTAC  
 TGCTACTCCG CCGGGTTCTG TTACTGTTC GCACCCGAAC ATCGAAGAAG TTGCTCTGTC  
 GACTACTGGT GAAATCCCGT TCTACGGTAA AGCTATCCCG CTCGAGGTTA TCAAAGGTGG  
 TCGTCACTG ATTTTCTGCC ACTCTAAAA AAAATGCGAC GAACTGGCTG CTAAGCTTGT  
 TGCTCTGGGT ATCAACGCTG TTGCTTACTA CCGTGGTCTG GACGTTTCTG TTATCCCGAC  
 TTCTGGTGAC GTTGTGTGTT TGGCCACTGA CGTCTGATG ACTGGTTACA CTGGTGACTT  
 CGACTCTGTT ATCGATTGCA ACACTTGCAA TTCCGGTGGT GGTGGTTCTA TGCAGAAAAA  
 AAACAAACGT AACACCAACC GTCGTCCGCA GGACGTTAAA TTCCCGGGTG GTGGTCAGAT  
 CGTTAAAACC TCTGAACGTT CTCAGCCGCG TGGGCGTCTG CAGCCGATCC CGAAAGCTCG  
 TCGTCCGGAA GGTCTGACCT GGGCTCAGCC GGGTTACCCG TGGCCGCTGT ACGGTAACGA  
 AGGTTGCGGT TGGGCTGGTT GGCTGCTGTC TCCGTAATAA GGATCC

SEC. ID. Nº 25

MAVDFI PVENLETTMRS PVFTDNSS PPVVPQS FQVAHLHAPTGS GKSTKVPAAAYAAQGYKVLVLN  
 PSVAATLGFAYMSKAHGIDPNIRTVRTITGSPITYSTY GKFLADGGCSGGAYDIIICDECHS  
 TDATSILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEI PFYKAI PLEVI  
 KGGRHLI FCHSKKKCDELA AKLVALGINAVAYYRGLDVSVI PTSGDVVVVATDALMTGYTGDFDS

VIDCNTCNSGGGSMQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRTW  
AQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSP

SEC. ID. Nº 26

GTTATCGATT GCAAACTTG CAATCCGGT GGTGGTGGTT CTATGCAGAA AAAAAACAAA  
CGTAAC

SEC. ID. Nº 27

GAATCCATG GCTGTTGACT TTATCCCGGT TGAAAATCTC GAGACTACTA TGC GTTCTCC  
GGTTTTCACT GACAACCTT CTCCGCCGGT TGTTCCGCAG TCTTTCCAGG TTGCTCACCT  
GCATGCTCCG ACTGGTTCTG GTAAATCTAC TAAAGTTCCA GCTGCTTACG CTGCTCAGGG  
TTACAAAGTT CTGGTTCTGA ACCCGTCTGT TGCTGCTACT CTGGGTTTCG GCGCTACAT  
GTCTAAAGCT CACGGTATCG ACCCGAACAT TCGTACTGGT GTACGACTA TCACTACTGG  
TTCTCCGATC ACTTACTCTA CTTACGGTAA ATTCCTGGCT GACGGTGGTT GCTCTGGTGG  
TGCTTACGAT ATCATCATCT GCGACGAATG CCACTCTACT GACGCTACTT CTATCCTGGG  
TATCGGTACC GTTCTGGACC AGGCTGAAAC TGCAGGTGCT CGTCTGGTTG TTCTGGCTAC  
TGCTACTCCG CCGGGTCTG TTACTGTTCC GCACCCGAAC ATCGAAGAAG TTGCTCTGTC  
GACTACTGGT GAAATCCCGT TCTACGGTAA AGCTATCCCG CTCGAGGTTA TCAAAGGTGG  
TCGTCACCTG ATTTTCTGCC ACTCTAAAA AAAATGCGAC GAACTGGCTG CTAAGCTTGT  
TGCTCTGGGT ATCAACGCTG TTGCTTACTA CCGTGGTCTG GACGTTTCTG TTATCCCGAC  
TTCTGGTGAC GTTGTGTTG TGGCCACTGA CGCTCTGATG ACTGGTTACA CTGGTGACTT  
CGACTCTGTT ATCGATTGCA ACACTTGCAA TTCCGGTGGT GGTGGTTCTA TGCTACCAA  
CCCGAAACCG CAGAAAAAAA ACAAACGTAA CACCAACCGT CGTCCGCAGG ACGTTAAATT  
CCCGGGTGGT GGTGAGATCG TTGGTGGTGT TTACCTGCTG CCGCGTCGTG GTCCGCTCT  
GGGTGTTCTG GCTACGCGTA AAACCTCTGA ACGTCTCAG CCGCGTGGGC GTCGTCAGCC  
GATCCCGAAA GCTCGTCGTC CGGAAGGTCG TACCTGGGCT CAGCCGGTT ACCCGTGGCC  
GCTGTACGGT AACGAAGGT GCGGTTGGGC TGGTGGCTG CTGTCTCCGC GTGGATCTCG  
TCCGCTTGG GGTCCGACCG ACCCGCGTCG TCGTCTCGT AACCTGGTA AAGTTATCGA  
TACCCTGACC TGCGGTTTCG CTGACCTGAT GGGTTACATA CCGCTGGTTG GAGCTCCGCT  
GGGTGGTCT GCTCGTGCTT AACCCATGGA TCC

SEC. ID. Nº 28

MAVDFIPVENLETTMRS PVFTDNSSPPVVPQS FQVAHLHAPTGS GKSTKVPAAYAAQGYKVLVLN  
PSVAATLGFGAYMSKAHGIDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTY GKFLADGGCSGGAYDIIICDECHS  
TDATSILGIGTVLDQAE TAGARLVV LATATPPGSVTVPHPNIEEVALSTGEIPFYGKAIPLEVI  
KGGRHLIFCHSKKKCDELA AKLVALGINAVAYYRGLDVS VIPTSGDVVVVATDALMTGYTGDFDS  
VIDCNTCNSGGGSMSTNPKPQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRK  
TSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSPRGRS RPSWGPTDPRRS  
RNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGARA

SEC. ID. Nº 29

GTTATCGATT GCAAACTTG CAATCCGGT GGTGGTGGTT CTATGTCTAC CAACCCGAAA  
CCGCAG

SEC. ID. Nº 30

TATAGGATCC ATGGGTAAAG CACGAGC

SEC. ID. Nº 31

GAATTCCATG GCTGTTGACT TTATCCCGGT TGAAAATCTC GAGACTACTA TCGGTTCTCC  
 GGTTTTCACT GACAACTCTT CTCCGCCGGT TGTTCCGCAG TCTTTCCAGG TTGCTCACCT  
 GCATGCTCCG ACTGGTTCTG GTAAATCTAC TAAAGTTCCA GCTGCTTACG CTGCTCAGGG  
 TTACAAAGTT CTGGTTCTGA ACCCGTCTGT TGCTGCTACT CTGGGTTTCG GCGCCTACAT  
 GTCTAAAGCT CACGGTATCG ACCCGAACAT TCGTACTGGT GTACGTAATA TCACTACTGG  
 TTCTCCGATC ACTTACTCTA CTTACGGTAA ATTCTGGCT GACGGTGGTT GCTCTGGTGG  
 TGCTTACGAT ATCATCATCT GCGACGAATG CCACTCTACT GACGCTACTT CTATCTGGG  
 TATCGGTACC GTTCTGGACC AGGCTGAAAC TGCAGGTGCT CGTCTGGTTG TTCTGGCTAC  
 TGCTACTCCG CCGGGTTCTG TTAAGTCTCC GCACCCGAAC ATCGAAGAAG TTGCTCTGTC  
 GACTACTGGT GAAATCCCGT TCTACGGTAA AGCTATCCCG CTCGAGGTTA TCAAAGGTGG  
 TCGTCACCTG ATTTTCTGCC ACTCTAAAAA AAAATGCGAC GAACTGGCTG CTAAGCTTGT  
 TGCTCTGGGT ATCAACGCTG TTGCTTACTA CCGTGGTCTG GACGTTTCTG TTATCCCGAC  
 TTCTGGTGAC GTTGTGTTG TGCCACTGA CGCTCTGATG ACTGGTTACA CTGGTGACTT  
 CGACTCTGTT ATCGATTGCA ACACTTGCAA TTCCATGTCT ACCAACCCGA AACCGCAGAA  
 AAAAAACAAA CGTAACACCA ACCGTCGTCC GCAGGACGTT AAATTCCCGG GTGGTGGTCA  
 GATCGTTTAC CTGCTGCCGC GTCGTGGTCC GCGTCTGGGT GTTACGCGTA AAACCTCTGA  
 ACGTTCTCAG CCGCGTGGGC GTCGTCAGCC GATCCCGAAA GCTCGTCGTC CGGAAGGTCC  
 TACCTGGGCT CAGCCGGGTT ACCCGTGCC GCTGTACGGT AACGAAGGTT GCGGTGGGG  
 TGGTTGGCTA CTGTCTCCGT AATAAGGATC C

SEC. ID. Nº 32

MAVDFI PVENLETTMRS PVFTDNSS PPVVPOS FQVAHLHAPT GSGKSTKVPAAYAAQGYKVLVLN  
 PSVAATLGFAYMSKAHGIDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADGGCCSGGAYDIIICDECHS  
 TDATSILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEIPFYGKAIPLEVI  
 KGGRHLIFCHSKKKCDELAACLVALGINAVAYRGLDVSVIPSTSGDVVVVATDALMTGYTGDFDS  
 VIDCNTCNMSMSTNPKFQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVYLLPRRGPRLGVTRKTSERSQPRGR  
 RQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSP

SEC. ID. Nº 33

ACCCAGACGC GGACCACGAC GCGGCAGCAG GTAAACGATC TGACCACCACCC

SEC. ID. Nº 34

CCGCGTCGTG GTCCGCTCT GGGTGTACG CGTAAACCT CTGAACGTTCTCAG

SEC. ID. Nº 35

GAATTCCATG GCTGTTGACT TTATCCCGGT TGAAAATCTC GAGACTACTA TCGGTTCTCC  
 GGTTTTCACT GACAACTCTT CTCCGCCGGT TGTTCCGCAG TCTTTCCAGG TTGCTCACCT  
 GCATGCTCCG ACTGGTTCTG GTAAATCTAC TAAAGTTCCA GCTGCTTACG CTGCTCAGGG

TTACAAAGTT CTGGTTCTGA ACCCGTCTGT TGCTGCTACT CTGGGTTTCG GCGCCTACAT  
 GTCTAAAGCT CACGGTATCG ACCCGAACAT TCGTACTGGT GTACGTACTA TCACTACTGG  
 TTCTCCGATC ACTTACTCTA CTTACGGTAA ATTCCTGGCT GACGGTGGTT GCTCTGGTGG  
 TGCTTACGAT ATCATCATCT GCGACGAATG CCACTCTACT GACGCTACTT CTATCCTGGG  
 TATCGGTACC GTTCTGGACC AGGCTGAAAC TGCAGGTGCT CGTCTGGTTG TTCTGGCTAC  
 TGCTACTCCG CCGGGTCTG TTACTIONTCC GCACCCGAAC ATCGAAGAAG TTGCTCTGTC  
 GACTACTGGT GAAATCCCGT TCTACGGTAA AGCTATCCCG CTCGAGGTTA TCAAAGGTGG  
 TCGTCACCTG ATTTTCTGCC ACTCTAAAA AAAATGCGAC GAACTGGCTG CTAAGCTTGT  
 TGCTCTGGGT ATCAACGCTG TTGCTTACTA CCGTGGTCTG GACGTTTCTG TTATCCCGAC  
 TTCTGGTGAC GTTGTGTGTG TGGCCACTGA CGCTCTGATG ACTGGTTACA CTGGTGACTT  
 CGACTCTGTT ATCGATTGCA ACACTTGCAA TTCCATGTCT ACCAACCCGA AACCGCAGAA  
 AAAAAACAAA CGTAACACCA ACCGTCGTCC GCAGGACGTT AAATTCCCGG GTGGTGGTCA  
 GATCGTTGGT CTGCTGCCGC GTCGTGGTCC GCGTCTGGGT CGTAAAACCT CTGAACGTTT  
 TCAGCCGCGT GGGCGTCGTC AGCCGATCCC GAAAGCTCGT CGTCCGGAAG GTCGTACCTG  
 GGCTCAGCCG GGTTACCCGT GGCCGCTGTA CCGTAACGAA GGTTCGGTT GGGCTGGTTG  
 GCTGCTGTCT CCGTAATAAG GATCC

SEC. ID. N° 36

MAVDFI PVENLETTMRS PVFTDNSS PPVVPQS FQVAHLHAPTGS GKSTKVPAAAYAAQGYKVLVLN  
 PSVAATLGFGAYMSKAHGIDPNIRTVRTITGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIIICDECHS  
 TDATSILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEI PFYKAI PLEVI  
 KGGRHLIFCHSKKKCDELAAKLVALGINAVAYRGLDVSVIPTSGDVVVVATDALMTGYTGDFDS  
 VIDCNTCNSMSTNPKPQKKNRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGLLPRRGPRLGRKTSERSQPRRRQ  
 PIPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNCGWAGWLLSP

SEC. ID. N° 37

GAATTCATG GCTGTTGACT TTATCCCGGT TGAAAATCTC GAGACTACTA TCGGTTCTCC  
 GGTTTTACT GACAACCTTT CTCCGCCGGT TGTTCCGCAG TCTTTCCAGG TTGCTCACCT  
 GCATGCTCCG ACTGGTTCTG GTAAATCTAC TAAAGTTCCA GCTGCTTACG CTGCTCAGGG  
 TTACAAAGTT CTGGTTCTGA ACCCGTCTGT TGCTGCTACT CTGGGTTTCG GCGCCTACAT  
 GTCTAAAGCT CACGGTATCG ACCCGAACAT TCGTACTGGT GTACGTACTA TCACTACTGG  
 TTCTCCGATC ACTTACTCTA CTTACGGTAA ATTCCTGGCT GACGGTGGTT GCTCTGGTGG  
 TGCTTACGAT ATCATCATCT GCGACGAATG CCACTCTACT GACGCTACTT CTATCCTGGG  
 TATCGGTACC GTTCTGGACC AGGCTGAAAC TGCAGGTGCT CGTCTGGTTG TTCTGGCTAC  
 TGCTACTCCG CCGGGTCTG TTACTIONTCC GCACCCGAAC ATCGAAGAAG TTGCTCTGTC  
 GACTACTGGT GAAATCCCGT TCTACGGTAA AGCTATCCCG CTCGAGGTTA TCAAAGGTGG  
 TCGTCACCTG ATTTTCTGCC ACTCTAAAA AAAATGCGAC GAACTGGCTG CTAAGCTTGT  
 TGCTCTGGGT ATCAACGCTG TTGCTTACTA CCGTGGTCTG GACGTTTCTG TTATCCCGAC  
 TTCTGGTGAC GTTGTGTGTG TGGCCACTGA CGCTCTGATG ACTGGTTACA CTGGTGACTT  
 CGACTCTGTT ATCGATTGCA ACACTTGCAA TTCCGGTGGT GGTGGTTCTA TGTCTACCAA  
 CCCGAAACCG CAGAAAAAAA ACAAACGTAA CACCAACCGT CGTCCGCAGG ACGTTAAATT  
 CCCGGGTGGT GGTCAGATCG TTGGTCTGCT GCCGCGTCGT GGTCCGCGTC TGGGTCGTAA  
 AACCTCTGAA CGTTCTCAGC CGCGTGGGCG TCGTCAGCCG ATCCCGAAAG CTCGTCGTCC  
 GGAAGGTCGT ACCTGGGCTC AGCCGGGTTA CCCGTGGCCG CTGTACGGTA ACGAAGGTTG  
 CCGTTGGGCT GGTGGCTGC TGTCTCCGTA ATAAGGATCC

SEC. ID. N° 38

MAVDFIPVENLETTMRS PVFTDNSS PPVVPQS FQVAHLHAPT GSGKSTKVPAAYAAQGYKVLVLN  
PSVAATLGF GAYMSKAHGIDPNIRTGVRTIT TGS PITYSTY GKFLADGGCSGGAYDII ICDECHS  
TDATSILGIGTVLDQAETAGARLVVLATAT PPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEI PFYGKAIPLEVI  
KGGRHLIFCHSKKKKDELA AKLVALGINAVAYRGLDVS VIPTSGDVVVVATDALMTGYTGDFDS  
VIDCNTCNSGGGGSMSTNPKPQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGLLPRRG PRLGRKTSERSQP  
RGRRQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSP

**SEC. ID. Nº 39**

AATTCATGG CTGTTGACTT TATCCCGGTT GAAAATCTCG AGACTACTAG CGTTCTCCGG  
TTTTCACTGA CAACTCTTCT CCGCCGGTTG TTCCGCAGCT TTCCAGGTTG CTCACCTGCA  
TGCTCCGACT GGTTCTGGTA AATCTACAAA GTTCCAGCTG CTTACGCTGC TCAGGGTTAC  
AAAGTTCTGG TTCTGACCCG TCTGTTGCTG CTACTCTGGG TTTCGGCGCC TACATGTCTA  
AAGCTCACGG TATCGACCCG AACATTCGTA CTGGTGTACG TACTATCACT ACTGGTTCTC  
CGATCACTTA CTCTACTTAC GGTAAATTCC TGGCTGACGG TGGTTGCTCT GGTGGTGCTT  
ACGATATCAT CATCTGCGAC GAATGCCACT CTACTGACGC TACTTCTATC CTGGGTATCG  
GTACCGTTCT GGACCAGGCT GAAACTGCAG GTGCTCGTCT GGTGTTCTG GCTACTGCTA  
CTCCGCCGGG TTCTGTTACT GTTCCGCACC CGAACATCGA AGAAGTTGCT CTGTCGACTA  
CTGGTGAAAT CCCGTTCTAC GGTAAAGCTA TCCCGCTCGA GGTTATCAAA GGTGGTCGTC  
ACCTGATTTT CTGCCACTCT AAAAAAAAAAT GCGACGAACT GGCTGCTAAG CTTGTTGCTC  
TGGGTATCAA CGCTGTTGCT TACTACCGTG GTCTGGACGT TTCTGTTATC CCGACTTCTG  
GTGACGTTGT TGTTGTGGCC ACTGACGCTC TGATGACTGG TTACTACTGGT GACTTCGACT  
CTGTTATCGA TTGCAACACT TGCAATTCCG GTGGTGGTGG TTCTATGTCT ACCAACCCGA  
AACC GCAGAA AAAAAACAAA CGTAACACCA ACCGTCGTCC GCAGGACGTT AAATTCCCGG  
GTGGTGGTCA GATCGTTAAA ACCTCTGAAC GTTCTCAGCC GCGTGGGCGT CGTCAGCCGA  
TCCCGAAAGC TCGTCGTCCG GAAGGTCGTA CCTGGGCTCA GCCGGGTTAC CCGTGGCCCG  
TGTACGGTAA CGAAGGTTGC GGTTGGGCTG GTTGGCTGCT GTCTCCGTAA TAAGGATCC

**SEC. ID. Nº 40**

MAVDFIPVENLETTMRS PVFTDNSS PPVVPQS FQVAHLHAPT GSGKSTKVPAAYAAQGYKVLVLN  
PSVAATLGF GAYMSKAHGIDPNIRTGVRTIT TGS PITYSTY GKFLADGGCSGGAYDII ICDECHS  
TDATSILGIGTVLDQAETAGARLVVLATAT PPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEI PFYGKAIPLEVI  
KGGRHLIFCHSKKKKDELA AKLVALGINAVAYRGLDVS VIPTSGDVVVVATDALMTGYTGDFDS  
VIDCNTCNSGGGGSMSTNPKPQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVKTSERSQPRGRRQPIPKARR  
PEGRTWAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSP

**SEC. ID. Nº 41**

KTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVYLLPRRG PRLGVTRKTS

**SEC. ID. Nº 42**

KTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRG PRLGVRATRKTS

**SEC. ID. Nº 43**

KTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVKTS

ES 2 409 631 T3

SEC. ID. Nº 44

GATCGCTCGA ATTCCTCG

SEC. ID. Nº 45

TTCTAGCGAG CTTAAGGAGC

SEC. ID. Nº 46

MSTNPKPQKKNKRNTNRR

SEC. ID. Nº 47

NKRNTNRRPQDVKFPGGG

SEC. ID. Nº 48

DVKFPGGGQIVGGVYLLP

SEC. ID. Nº 49

VGGVYLLPRRGPRLGVRA

SEC. ID. Nº 50

GPRLGVRATRKTSERSQP

SEC. ID. Nº 51

KTSERSQPRGRRQPIPKA

SEC. ID. Nº 52

RRQPIPKARRPEGRTWAQ

SEC. ID. Nº 53

PEGRTWAQPGYPWPLYGN

SEC. ID. Nº 54

QYPWPLYGNEGCGWAGWLL

SEC. ID. Nº 55

CGWAGWLLSPRGSRPSW

SEC. ID. Nº 56

WLLSPRGSRPSWGPTDPRRRSRNLG

SEC. ID. Nº 57

SWGPTDPRRRSRNLGKVIDTLTCGF

SEC. ID. Nº 58

SRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLV

SEC. ID. Nº 59

LTCGFADLMGYIPLVGAPLGAARA

SEC. ID. Nº 60

YIPLVGAPLGAARALAHGVRVLED

SEC. ID. Nº 61

GAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLP

SEC. ID. Nº 62

LEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLA

SEC. ID. Nº 63

LPGCSFSIFLLALLSCLTPASA