

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 920**

51 Int. Cl.:

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2003 E 03749938 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 1504266**

54 Título: **Procedimiento de detección simultánea de un antígeno y de un anticuerpo de un microorganismo infeccioso**

30 Prioridad:

10.05.2002 FR 0205808

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

13.12.2013

73 Titular/es:

**BIO-RAD INNOVATIONS (100.0%)
3, Boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-La-Coquette, FR**

72 Inventor/es:

**RIEUNIER, FRANÇOIS;
FEYSSAGUET, MURIEL;
HENRIOT, STÉPHANIE y
LAMBERT, NADINE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 433 920 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

Procedimiento de detección simultánea de un antígeno y de un anticuerpo de un microorganismo infeccioso.

5 La invención se refiere a la detección *in vitro* de una infección por un microorganismo infeccioso, especialmente viral, y en particular la detección *in vitro* de una infección por un virus de la hepatitis C (VHC). La invención se refiere más precisamente también a un procedimiento de detección simultánea de un antígeno de un microorganismo infeccioso, en particular viral, y de anticuerpos dirigidos contra este mismo microorganismo infeccioso así como los reactivos y kits que lo aplican. Más particularmente, se refiere a un procedimiento de detección simultánea de antígeno VHC y de anticuerpos anti-VHC, y los reactivos y kits que lo aplican.

La infección por el virus de la hepatitis C, una hepatitis inicialmente denominada hepatitis No-A, No-B es un problema de salud preocupante y reconocido desde hace mucho tiempo, en particular en transfusión sanguínea.

15 La solicitud de patente EP 318 216 publicada el 31 de mayo de 1989 describe la clonación de fragmentos del ADNc de un virus responsable de la hepatitis C en el ser humano, denominado HCV (en inglés) o VHC (en español). Describe asimismo la secuencia de cinco genes que codifican las proteínas no estructurales (NS1 a NS5) del virus (aproximadamente el 78% del genoma total del VHC), el antígeno C100-3 (que contiene 363 aminoácidos de la región NS3-NS4 y fusionado al superóxido dismutasa) así como a un procedimiento de detección de anticuerpos anti-VHC con la ayuda del antígeno C100-3. Este procedimiento de detección de anticuerpos anti-VHC, denominado de primera generación, ha permitido, entre otros, establecer que el VHC es la principal causa de la hepatitis No-A, No-B, ahora denominada hepatitis C, en el mundo. Sin embargo, este procedimiento no permite detectar más del 70 al 80% de los sueros infectados por el virus. Esta falta de sensibilidad no permite tampoco una detección precoz de las infecciones.

25 Okamoto *et al.* (1990a) y la solicitud de patente EP 388 232 publicada el 19 de septiembre de 1990 describen la secuencia terminal 5' del genoma del virus VHC, es decir la secuencia de los genes que codifican las proteínas estructurales (cápside, matriz, envoltura) del virus responsable de la hepatitis C.

30 Okamoto *et al.* (1990b) publican la utilización de la secuencia de aminoácidos 39-74 del cápside del VHC como diana de detección ELISA de anticuerpos anti-VHC.

El artículo Hosein *et al.* (1991) describe un inmunoensayo de detección de anticuerpos anti-VHC fundado en el uso de antígenos peptídicos sintéticos estructurales (cápside: en la región AA 1-120) y no estructurales (ND3-NS4: en la región AA 1200-1800). Demuestra el interés de los péptidos sintéticos en la detección de anticuerpos anti-VHC y de la combinación de los antígenos estructurales y no estructurales: aumenta la sensibilidad, y por lo tanto la precocidad, de la detección. El ensayo descrito aquí permite una detección de anticuerpos más precoz de 4 a 10 semanas. El artículo muestra también que no existe epítipo inmunodominante principal, como se conoce, por ejemplo, del virus del SIDA.

40 Nasoff *et al.* (1991) constatan que la mayoría de los epítipos inmunorreactivos dominantes de la cápside están localizados en la región N-terminal (AA 1-40) y que los anticuerpos dirigidos contra estos epítipos aparecen precozmente después de la infección.

45 Los ensayos de detección de anticuerpos anti-VHC denominados de segunda generación (es decir fundados sobre la utilización simultánea de antígenos de captura no estructurales y estructurales) constituyen un progreso significativo frente a ensayos de primera generación. Sin embargo, carecen todavía de sensibilidad: detectan en efecto como mucho el 95 al 98% de los sueros extraídos en pacientes contaminados por el VHC. Por consiguiente, esta detección es todavía demasiado poco precoz y deja también pasar desapercibidas donaciones de sangre infectada en transfusión sanguínea. En efecto, para reducir los riesgos post-transfusionales, es necesario detectar la presencia del virus en sí mismo, antes de la aparición de anticuerpos, y lo más pronto posible después de la contaminación. Este periodo entre la contaminación y la seroconversión (es decir la aparición de anticuerpos) se denomina "ventana serológica".

55 Diferentes equipos (Garson *et al.* (1990); Shiel *et al.* (1991)) han propuesto la detección del ARN viral por la PCR (reacción en cadena por la polimerasa) para resolver el problema de sensibilidad y de precocidad evocada antes. Este método permite en efecto una detección extremadamente sensible y precoz de la infección por VHC, es decir sólo algunos días después de la exposición al virus, es decir 4 a 8 semanas antes de la elevación de los anticuerpos antivirales circulantes. Constituye actualmente el método de referencia para la detección del virus en los fluidos biológicos.

60 Sin embargo, el método de PCR aplicado al VHC se enfrenta a diversas dificultades. Por un lado, implica la realización de pre-etapas de extracción, purificación del ARN, y después transcripción inversa del ARN en ADNc, y una parte del material viral se pierde durante estas etapas previas. Por otro lado, requiere un equipamiento de amplificación específico y costoso. Además, no permite tratar simultáneamente un gran número de muestras y da frecuentemente lugar a contaminaciones.

Otro enfoque, para la detección precoz de la infección por el VHC, consistió en la detección del antígeno viral (cápside) circulante. Este antígeno aparece también varias semanas antes de la aparición de los anticuerpos anti-VHC séricos. Takahashi *et al.*, (1992) describen una técnica ELISA que detecta el antígeno de la cápside con la ayuda de una pareja de anticuerpos.

Sin embargo, la detección de este antígeno es difícil de elaborar debido, en su gran parte, al bajo índice de antígeno detectable en la sangre y a la calidad de los reactivos inmunológicos disponibles.

Hajime Tokita *et al.* (2000) describen un inmunoensayo de tipo sándwich con la ayuda de una pareja de anticuerpos monoclonales (5F11 y 5E3), conocido en el mercado bajo el nombre de "Immucheck F HCV Ag Core Kokusai", de detección muy sensible. Los autores de este artículo subrayan que una mutación Thr49Pro en la proteína de la cápside reduce la sensibilidad del ensayo. Buscando igualmente detectar el antígeno de la cápside en un estado precoz, Peterson *et al.* (2000) exponen una técnica de detección ELISA del antígeno de la cápside del VHC con la ayuda de anticuerpos monoclonales anti-cápside, sin pretratamiento de la muestra. El artículo muestra, gracias a la comparación de tres ensayos independientes (detección del ARN del VHC por la PCR, de los anticuerpos anti-VHC y del antígeno de la cápside por ELISA), que así el antígeno de la cápside circulante del VHC puede ser detectado útilmente en bolsas de sangre extraída durante la fase seronegativa precoz de la infección (es decir aproximadamente 1 días después de la detección del ARN).

La precocidad de la detección de la infección por el virus de la hepatitis C asociada a la posibilidad de detectar las respuestas anticuerpos posteriores a la seroconversión en toda la duración de la infección sigue siendo un objetivo en la actualidad, muy particularmente en transfusión.

En la óptica de disponer de un método simple, sensible, específico, reproducible, barato y de realización fácil, automatizable - en vista a la detección de masa - para detectar, en primer lugar el antígeno VHC durante el tiempo de la ventana serológica, y después seguir la evolución serológica del paciente después de la seroconversión, combinar una detección unos anticuerpos anti-VHC y una detección de antígeno de VHC es muy deseable.

Sin embargo, esto plantea un problema mayor, el de la interferencia, sobre la determinación del antígeno de VHC, entre los anticuerpos anti-VHC presentes en el suero y unos anticuerpos anti-VHC marcados. Así, la introducción sobre una fase sólida, en vista a la detección de un anticuerpo dado, de un antígeno diana que tendría los mismos epítopos que los reconocidos por el o los anticuerpos marcados, utilizados en vista a la detección simultánea en sándwich de un antígeno, conllevaría irremediablemente una fijación de anticuerpos marcados sobre la fase sólida y por lo tanto una respuesta falsamente positiva del ensayo.

Este es particularmente el caso en un sistema de detección simultáneo, en la misma fase sólida, de anticuerpos anti-cápside del VHC y de antígeno de cápside del VHC. Así, el depósito sobre la fase sólida, en vista a la detección de anticuerpos anticápside del VHC, de un antígeno de cápside que tiene los mismos epítopos que los reconocidos por el o los anticuerpos anti-cápside VHC marcados utilizados en vista a la detección del antígeno capsídico conllevaría una fijación de anticuerpos marcados sobre la fase sólida y resulta en una respuesta falsamente positiva del ensayo.

Para esquivar este riesgo de interferencia, Chiron Corp. ha realizado unos ensayos que detectan el antígeno de la cápside y los únicos anticuerpos anti-NS3/NS4 de pacientes. Para ello, Chiron ha aplicado por un lado un antígeno NS3/4a fijado sobre una fase sólida, para capturar los anticuerpos anti-VHC de la muestra ensayada, y por otro lado unos anticuerpos monoclonales (c11-3 y C11-7) anti-cápside del VHC, asimismo fijados. Los anticuerpos capturados eran detectados por un antígeno fusionado con SOD (superóxido dismutasa) en presencia de un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa, mientras que el antígeno capturado era detectado por otro anticuerpo monoclonal marcado también con peroxidasa ((VII European Congress of the International Society of Blood Transfusion - Paris, 15-18 juillet 2001).

Frente al problema de las interferencias, la solicitud EP 1 020 727 (Advanced Life Science Institute) propone un método de medición simultánea del antígeno de la cápside VHC y de los anticuerpos anti-cápside VHC (un ensayo de tipo "combo"), en la que el antígeno es capturado y marcado por anticuerpos dirigidos contra epítopos capsídicos diferentes de los epítopos capsídicos que sirven simultáneamente para la captura y la revelación o detección de anticuerpos anti-cápside. Un ejemplo representativo se da en que, en el ensayo simultáneo de detección del antígeno en sándwich y unos anticuerpos en ensayo indirecto, se utiliza, para detectar el antígeno, un primer anticuerpo (de captura), dirigido contra los epítopos de la secuencia del aminoácido (AA) 100 al aminoácido 130 de la cápside del VHC, y un segundo anticuerpo (de detección), dirigido contra los epítopos de la secuencia AA40-50 y, para detectar los anticuerpos, el antígeno de captura utilizado contiene, por su parte, las secuencias AA1-42 y AA66-80.

Este método no está sin embargo libre de inconvenientes, en particular porque necesita la utilización de anticuerpos dirigidos contra epítopos relativamente distantes los unos de los otros, y que son de hecho unos epítopos menores, poco inmunógenos. Tiene el inconveniente además, debido a la ausencia de la secuencia AA43-65, de no detectar los anticuerpos dirigidos contra esta última secuencia y por lo tanto de pérdida en sensibilidad.

Además, se realiza la captura del antígeno capsídico y la captura de los anticuerpos anti-cápside mediante dos zonas de la proteína de la cápside claramente distintas, es decir no superpuestas (AA 1-42 y AA 66-80 para detectar los anticuerpos y AA 100-130 para detectar el antígeno) a diferencia de la presente invención.

La solicitud de patente WO 01/96875 A2 (CHIRON) describe, entre otros, un ensayo de detección simultánea de la cápside y de los anticuerpos anti NS3 y NS4 (un "combo incompleto", figura 2) que hace uso de la N-laurilsarcosina como detergente. Evoca, por el contrario, muy someramente, en la figura 8 y página 33, un ensayo "combo completo", es decir un ensayo de detección simultánea del antígeno de la cápside (en sándwich) y unos anticuerpos anti-cápside y anti-proteínas no estructurales del VHC (en sándwich doble antígeno). Se utiliza, para capturar el antígeno, dos anticuerpos, c11-3 y c11-7, conocidos por reconocer una amplia porción N-terminal (AA 10-53) de la cápside del VHC, y para la detección de un tercer anticuerpo, c11-14, conocido por reconocer una porción C-terminal (AA 120-130) de la cápside del VHC. Para detectar los anticuerpos, el antígeno de captura utilizado es un antígeno de fusión con epítomos múltiples ("MEFA 12", véase la tabla 2 de la solicitud WO 01/96875) que contiene, en fusión con un fragmento de superóxido-dismutasa ("SOD"), unos antígenos NS3, NS4, NS5 y unas series de secuencias capsídicas de varias capas de VHC: AA 9-53, portadora de la mutación R47L, AA 64-88 y AA 67-84. Las secuencias AA 54-53 y AA 54-66 están ausentes en estas dos series de secuencia.

Sin embargo, la aplicación del ensayo "combo completo" de la solicitud de patente WO 01/96875 A2 no está descrita. Por lo tanto, es imposible para el experto en la materia determinar claramente y sin ambigüedad si el ensayo combo de la figura 8 puede funcionar, aún menos si puede satisfacer al problema planteado, es decir detectar tan precozmente como sea posible la infección por un VHC. En cualquier caso, está claro que, en el mejor de los casos, el combo de la solicitud de patente WO 01/96875 A2 perdería inevitablemente la detección de todos los anticuerpos dirigidos contra las secuencias que faltan AA 54-63 y AA 54-66. Tendría como consecuencia un riesgo de pérdida de sensibilidad.

La solicitud de patente EP 1 251 353 A2 (Ortho-Clinical Diagnostics) describe un ensayo "combo completo" que utiliza los mismos anticuerpos para la detección de la cápside, pero sin precisar su origen ni su especificidad epitópica. Además, precisa que el detergente utilizado es un detergente de tipo BRIJ o MYRJ, que aparentemente es preferido por la N-lauril sarcosina del kit de detección del antígeno capsídico comercializado por Ortho Clinical Diagnostics (véase el ejemplo 3). La detección de los anticuerpos anti-cápside se realiza con la ayuda de un antígeno de la cápside modificado (por mutagénesis): C22KSNV47,48 (proteína de fusión con la SOD que comprende la secuencia capsídica AA 10-99 suprimida de los aminoácidos 47 y 48) o C22KSR47L (proteína de fusión con SOD que comprende la secuencia capsídica AA 10-99, con una leucina que sustituye una arginina en posición 47).

La solicitud de patente WO 03/002 749 A2 (Abbott) describe numerosos antígenos y ensayos de detección de antígeno capsídico del VHC. El único ensayo "combo completo" que describe, bajo el nombre de "Real Combo" (figura 1 y página 59) hace uso, para la detección de los anticuerpos anti-cápside, de un péptido biotinilado que corresponde a los aminoácidos 11-28 de la cápside, inmovilizado en fase sólida. Para la detección de la cápside, utiliza la combinación de anticuerpos de Advanced Life Science Institute C11-14 (que reconoce la secuencia capsídica AA 45-50) en fase sólida y C11-10 (que reconoce la secuencia capsídica AA 32-36) marcada con acridina. La solicitud WO 03/002 749 A2 realiza por lo tanto la captura del antígeno capsídico y la captura de los anticuerpos anti-cápside a través de dos sitios capsídicos claramente distintos, es decir no superpuestos (AA 11-28 para detectar los anticuerpos y AA 45-50 para detectar el antígeno) a diferencia de la presente invención.

Los autores de la presente invención se empeñaron en elaborar un método alternativo para resolver el problema planteado.

Se ha encontrado ahora un método de detección simultánea de un antígeno de VHC y unos anticuerpos de un paciente dirigidos contra este antígeno que evita este problema de interferencia y que alcanza niveles de sensibilidad y precocidad de detección que se acercan a los de la PCR, permitiendo al mismo tiempo seguir la evolución serológica del paciente después de la seroconversión.

Los autores de la invención resuelven este problema haciendo artificialmente diferentes, por modificación de estructura, ciertos epítomos de los antígenos diana utilizados para capturar los anticuerpos. Los epítomos así modificados son entonces destruidos. Simultáneamente, los anticuerpos utilizados para la captura y/o la detección de los antígenos son seleccionados de tal manera que reconocen precisamente unos epítomos no modificados presentes en los antígenos del paciente, y que no pueden así unirse a los antígenos modificados, que no presentan estos mismos epítomos. Ya que los epítomos ya no son idénticos, no existe ya competición entre los anticuerpos utilizados para capturar y/o detectar el antígeno de VHC y los anticuerpos del paciente. Contrariamente a un cierto número de técnicas de la técnica anterior, la captura del antígeno de la cápside y la de los anticuerpos anti-cápside podrá hacerse sobre una sola y misma zona proteica de la cápside y evitará la pérdida de detección de un cierto número de anticuerpos anti-cápside, como se verá más adelante.

Ya que se han identificado múltiples epítomos en la parte N-terminal de la cápside, esta zona proteica es la más

apropiada para obtener al mismo tiempo una detección muy sensible del antígeno de cápside y de los anticuerpos anti-cápside.

5 Gracias a la presente invención, es posible utilizar simultáneamente para la detección de los anticuerpos y de los antígenos las secuencias más inmunorreactivas y aumentar así la sensibilidad de la detección.

10 No hace falta decir que la invención no está limitada a la detección de la única infección debida al virus de la hepatitis C (VHC). Abarca asimismo la generalización del procedimiento, de los reactivos y de los kits descritos a continuación, la detección de la infección y/o del seguimiento de la infección, debida a cualquier tipo de microorganismo infeccioso (como virus, tales como, por ejemplo, los virus responsables de las diversas hepatitis A, B, C, D o E, los retrovirus, en particular los retrovirus responsables del SIDA en el ser humano (VIH-1, VIH-1 grupo O, VIH-2) o el mono, el citomegalovirus (CMV), los flavivirus, entre ellos los virus del dengue, así como las bacterias, los parásitos microbianos, etc.) para los cuales es deseable una detección simultánea de antígenos y de anticuerpos. La invención, más particularmente descrita aquí para el virus de la hepatitis C (VHC), es de un alcance
15 muy general que el experto en la materia aprenderá fácilmente. La invención es tal como se define en las reivindicaciones 1 a 31.

Definiciones

20 El término "virus de la hepatitis C" o "VHC" cubre aquí todas las cepas, todos los tipos, sub-tipos y genotipos del virus responsable de la hepatitis C. El procedimiento de la invención pretende en efecto detectar cualquier infección por VHC, sea cual sea su origen y su genotipo. Esto comprende en particular los tipos y sub-tipos bien conocidos del virus que circula en Europa, en los Estados Unidos de América, en Japón, etc. (es decir los 6 genotipos mayores: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y subtipos 1a, 1b, 3a, etc.), Véase Stuyver *et al.*, (1994); Bukh (1995).

25 Por "virus de la inmunodeficiencia humana" o "VIH", se entienden todas las cepas, todos los tipos, sub-tipos, grupos y genotipos del retrovirus responsable del SIDA en el ser humano. El término VIH agrupa en particular los VIH-1 (VIH-1 del grupo M, VIH-1 del grupo O), y los VIH-2 y sus variantes.

30 En el contexto de la invención, una "muestra biológica" está preferentemente constituida por un fluido biológico, tal como sangre, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, etc.

35 El término "anticuerpo" se refiere a cualquier anticuerpo entero o fragmento funcional de un anticuerpo que comprende o consiste en al menos un sitio de combinación antigénico, que permite a dicho anticuerpo de unirse a al menos un determinante antigénico de un compuesto antigénico. A título de ejemplo de fragmentos de anticuerpos, se pueden citar los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, así como las cadenas scFv (Single Chain variable fragment), dsFv (Double-stranded variable fragment), etc. Estos fragmentos funcionales se pueden obtener en particular por ingeniería genética.

40 La producción de anticuerpos monoclonales o de sueros policlonales mono-específicos útiles en el ámbito de la invención depende de técnicas convencionales, que son detalladas más adelante.

45 Por "anticuerpos de captura" se entiende un anticuerpo o una parte de anticuerpos, preferentemente fijado sobre una fase sólida, que es capaz de retener un antígeno del microorganismo, por ejemplo VHC o VIH, presente en una muestra biológica, por unión de afinidad.

50 La presencia de los anticuerpos y antígenos en la muestra biológica está revelada por "medios de detección". Tratándose de la detección del antígeno, la invención prevé en particular una detección con la ayuda de al menos un "anticuerpo de detección". Tal anticuerpo de detección, marcado, es capaz de unirse al antígeno capturado, por unión de afinidad, reconociendo un sitio epitópico, diferente del reconocido por el anticuerpo de captura, o idéntico debido a la presencia de unidad repetitiva a nivel de la cápside. Tratándose de la detección de los anticuerpos, se pueden utilizar en particular unos anticuerpos anti-inmunoglobulina, o anti-isotipo, marcados, por ejemplo unas anti-inmunoglobulinas G.

55 El término "marcado" se refiere tanto a un marcado directo (por medio de enzimas, radioisótopos, fluorocromos, compuestos luminescentes, etc.) como a un marcado indirecto (por ejemplo, por medio de anticuerpos, ellos mismos marcados de manera directa o con la ayuda de reactivos de un "par de afinidad" marcado, tal como, pero no exclusivamente, el par avidina marcado-biotina, etc.).

60 Por "*fragmento antigénico*" se entiende todo o parte de una proteína natural o recombinada de un microorganismo infeccioso, tal como el virus de la hepatitis C o el VIH, capaz de inducir la síntesis de anticuerpos en un paciente infectado o en un animal inmunizado. Puede tratarse, en particular, de todo o parte de la proteína de la cápside, o proteínas no estructurales del VHC, en particular NS3 y NS4, ya sean obtenidas por ingeniería genética o no. Puede tratarse, en particular, de todo o parte de una proteína codificada por el gen gag de un VIH, en particular el P25 (VIH-1) o la P26 (VIH-2), o de una proteína codificada por el gen de envoltura, en particular la gp41 (VIH-1) o la gp36 (VIH-2).
65

Por "antígeno de captura" se entiende un fragmento antigénico aislado, preferentemente fijado en una fase sólida, que es capaz de ser reconocido por anticuerpos dirigidos contra el microorganismo, tales como anticuerpos anti-VHC o anti-VIH y permitir una unión de afinidad con estos últimos.

Por "*antígeno de detección*" se entiende un antígeno marcado y modificado como el antígeno de captura (es decir que contiene al menos un sitio epitópico o epítipo destruido). Permite detectar o bien por competición el antígeno capturado, o bien detectar anticuerpos mediante el método sándwich antígeno-anticuerpo-antígeno clásico, también denominado método "sándwich doble antígeno" (Maiolini *et al.*, (1978)).

Conforme a la presente invención, el antígeno de captura y/o el antígeno de detección eventualmente utilizado, en particular en detección de anticuerpos por sándwich antígeno-anticuerpo-antígeno, contiene al menos un sitio epitópico o epítipo destruido. Un "*sitio epitópico*" o "*epítipo*" es una secuencia de aminoácidos que es reconocido por un anticuerpo y permite la unión específica de este.

En lo que se refiere a las proteínas del VHC, se han identificado varios epítipos de la proteína de la cápside. Se conocen en particular los epítipos localizados entre el aminoácido 16 y el aminoácido 40, y entre el aminoácido 44 y el aminoácido 47. Puede referirse así, por ejemplo, a los artículos o divulgaciones Okamoto *et al.* (1990); Nasoff *et al.* (1991); Leahy *et al.* (1991); Takahashi *et al.* (1992); Sällberg *et al.* (1992); e Ishida, (1993).

Numerosos epítipos de proteínas no estructurales de VHC son conocidos asimismo por el experto en la materia. En la proteína NS3, se conocen los epítipos localizados entre el aminoácido 1188 y el aminoácido 1493 (Yang *et al.* (1995)), entre el aminoácido 1175 y el aminoácido 1334 (Yang *et al.* (1999)), y un epítipo entre el aminoácido 1460 y el aminoácido 1532 (Clayes *et al.* (1995)).

Uno de los epítipos NS4 más conocido, el epítipo 5-1-1 (AA 1689-1706) está citado en Cerino *et al.* (1991).

En lo referente al VIH, se han descrito también varios epítipos en la técnica anterior. Se trata en particular de epítipos de la proteína P25 del VIH-1 (grupo M) localizados entre los aminoácidos 293 a 350, pero también del epítipo inmunodominante de la gp41 descrito por Gnann *et al.* (1987) o una variante de esta secuencia; se trata también de un epítipo de la proteína P26, en particular un epítipo de secuencia homóloga a la del epítipo P25 del VIH-1 descrito anteriormente, por ejemplo, o de un epítipo de la gp36 del VIH-2, en particular el epítipo inmunodominante de la gp36 descrito por Gnann *et al.* (1987), o una variante de esta secuencia.

Por sitio epitópico o epítipo "*destruido*" se entiende que este está modificado en su estructura (primaria, secundaria, terciaria y/o cuaternaria) de manera que el antígeno de captura, o de detección, que comprende este epítipo destruido no pueda unirse al anticuerpo de captura, y/o al anticuerpo de detección, dirigido contra el antígeno detectado simultáneamente, conservando al mismo tiempo la capacidad de unir los anticuerpos dirigidos contra el microorganismo, tales como los anticuerpos anti-VHC o anti-VIH, eventualmente presentes en la muestra biológica, por reconocimiento de otros sitios epitópicos que permanecen intactos. En consecuencia, los anticuerpos de captura y/o de detección son seleccionados a fin de reconocer específicamente el epítipo en cuestión en su forma "intacta", es decir "no destruida" o "nativa", sobre el antígeno presente en la muestra biológica. En el ámbito de la presente invención, este epítipo en su forma intacta es asimismo denominado epítipo "*homólogo*" del epítipo destruido.

El término "*específicamente*", cuando se refiere a un reconocimiento o a una unión específica de un anticuerpo para un antígeno, significa que el anticuerpo interactúa con el antígeno sin interacción sustancial con otros antígenos, o si se habla de reconocimiento "*específico*" con un epítipo, por reconocimiento casi exclusivo de este epítipo. Se prefieren constantes de asociación superiores a $10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Anticuerpos de captura y de detección

Los anticuerpos utilizados en la presente invención son unos anticuerpos específicos del antígeno y, por esta razón, son unos anticuerpos monoclonales o unos anticuerpos policlonales monoespecíficos, es decir que reconocen específicamente sólo un epítipo.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener según el método clásico de fusión linfocitaria y cultivo de hibridomas descrito por Köhler y Milstein (1975). Otros métodos de preparación de anticuerpos monoclonales son igualmente conocidos (Harlow *et al.* (1988)). Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados inmunizando un mamífero (por ejemplo un ratón, una rata, un conejo, incluso un ser humano, etc.) y utilizando la técnica de fusión linfocitaria que conduce a hibridomas (Köhler y Milstein, 1975).

Existen técnicas alternativas a esta técnica usual. Se pueden, por ejemplo, producir unos anticuerpos monoclonales por expresión de un ácido nucleico clonado a partir de un hibridoma. Se pueden asimismo producir unos anticuerpos mediante la técnica de expresión sobre fago ("Phage display"), introduciendo unos ADNc de anticuerpos en vectores, que son típicamente fagos filamentosos (por ejemplo, fUSE5 para *E. coli*, Scott *et al.* (1990)). Estos últimos constituyen bancos y presentan fragmentos scFv en su superficie. Unos protocolos de construcción de estos bancos

de anticuerpos están descritos en Marks *et al.* (1991).

Los anticuerpos policlonales se pueden obtener a partir del suero de un animal inmunizado contra un antígeno de naturaleza peptídica según los métodos de realización habituales.

De manera general, se puede utilizar por ejemplo como inmunógeno un polipéptido, en particular recombinado, o un oligopéptido. Según un protocolo clásico, se inmunizan unos conejos con el equivalente de 1 mg del inmunógeno peptídico según el procedimiento descrito por Benoit *et al.* (1982). A intervalos de cuatro semanas, los animales son tratados por inyecciones de 200 µg de antígeno y sacrificados de 10 a 14 días más tarde. Después de la tercera inyección, se evalúa la capacidad del antisuero para unirse al péptido antígeno radiomarcado con yodo, preparado mediante el método de cloramina-T. Se purifica después por cromatografía sobre columna intercambiadora de iones constituida de carboximetilcelulosa (CMC). Las moléculas de anticuerpos recogidas por elución se ajustan después a la concentración deseada mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo utilizando DEAE Sephadex para obtener la fracción IgG.

Con el fin de aumentar la especificidad del suero policlonal, los anticuerpos pueden ser purificados mediante una cromatografía de inmunoafinidad (o de inmunoadsorción) utilizando unos péptidos (tales como los péptidos de la cápside AA 16-44 y AA 39-74 del VHC, a título de ejemplo no limitativo) que sirvió para la inmunización e inmovilizados en fase sólida. El antisuero se pone en contacto con tal péptido inmovilizado en fase sólida durante un periodo suficiente a fin de hacer inmuno-reaccionar el péptido con la molécula de anticuerpo a fin de formar un complejo inmunológico en fase sólida.

Los inventores han utilizado así más particularmente los anticuerpos anti-VHC específicos indicados en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1

Anicuerpo monoclonal	Clase	Epítipo natural reconocido
Acm 1	IgG2a	⁴⁰ LGVR ⁴⁷ (SEC ID nº 19)
Acm 2	IgG2a	³⁰ IVGGVYL ³⁶ (SEC ID nº 20)
Acm 3	IgG1	²⁹ QIVGGV ³⁴ (SEC ID nº 21)
Acm 4	IgG1	²⁹ QIVGGV ³⁴ (SEC ID nº 21)
Acm 5	IgG1	³⁰ IVGGVYL ³⁶ (SEC ID nº 20)
Acm 6	IgG1	³⁰ IVGGVYL ³⁶ (SEC ID nº 20)

En lo referente al ensayo combo para la detección del VIH, el anticuerpo utilizado es preferentemente un anticuerpo monoclonal que reconoce una de las secuencias polipeptídicas siguientes, o la secuencia correspondiente de una cepa VIH variante:

- epítipo de la proteína P25 de un VIH-1 del grupo M de secuencia 308QASQEVKNWMTETLL322 (SEC ID nº 24);
- epítipo de la proteína P26, en particular un epítipo de secuencia homóloga de la del epítipo de la P25 del VIH-1 descrito por el identificador de secuencia SEC ID nº 24, como por ejemplo un epítipo que contiene la secuencia QTPAVKNWMTQTLL (SEC ID nº 25) (aislado VIH-2: ROD).

Por supuesto, está al alcance del experto en la materia producir o procurarse unos anticuerpos monoclonales, de especificidad epitópica similar o idéntica a la descrita para los anticuerpos anteriores, y que convienen a la realización de la presente invención.

Antígeno de captura y/o de detección

El antígeno de captura y/o el antígeno de detección, utilizado en la invención, contiene al menos un sitio epitópico destruido. La destrucción de al menos dos sitios sobre el antígeno puede ser necesaria cuando se utilizan dos anticuerpos diferentes, que corren el riesgo de interactuar ambos con el antígeno de captura y/o el antígeno de detección. Es el caso, por ejemplo, para los inmunoensayos de tipo sándwich, que utilizan un anticuerpo de captura inmovilizado sobre la misma superficie que el antígeno de captura, y un anticuerpo de detección. El anticuerpo de captura se selecciona entonces de manera que reconozca específicamente un epítipo, sobre el antígeno natural del paciente, homólogo de uno de los dos epítipos destruidos sobre el antígeno de captura, mientras que el anticuerpo de detección se selecciona de manera que reconozca específicamente un epítipo, sobre el antígeno natural del paciente, homólogo del otro de los dos epítipos destruidos sobre el antígeno de captura.

El antígeno de captura y/o el antígeno de detección, puede comprender o consistir en, un péptido que imita todo o parte de un epítipo procedente de una proteína antigénica del microorganismo, en particular del VHC o de un VIH.

Preferentemente, se trata de un péptido de la proteína de la cápside, siendo la detección de los anticuerpos anti-cápsides particularmente ventajosa, en particular en el caso de hepatitis crónicas, en las que se observan muy pocos antígenos, y ventajosamente unos anticuerpos anti-cápside circulantes. Puede asimismo tratarse de péptido(s) de una proteína no estructural, tal como la NS3 y/o la NS4. Diversos antígenos de captura, o de detección, pueden asimismo ser combinados juntos. Este modo de realización, que utiliza varios antígenos de captura, y/o de detección, diferentes, permite por ejemplo, la detección simultánea de anticuerpos anti-cápside y de anticuerpos antiproteínas no estructurales NS3 y/o NS4 del VHC. Es particularmente preferida una detección simultánea de los anticuerpos anti-cápside y de los anticuerpos anti-NS3. La invención comprende asimismo una detección simultánea de antígeno capsídico, de anticuerpos anti-cápside, de anticuerpo anti-proteínas estructurales de envoltura E1 y/o E2, de antígeno de envoltura E1 y/o E2, y/o de anticuerpos anti-proteínas no estructurales NS3 y/o NS4 del VHC. Otras combinaciones posibles pertenecen también a la invención.

Asimismo, la detección simultánea de antígeno gag, de anticuerpos anti-gag, y/o de anticuerpo anti-envoltura de virus del SIDA (VIH-1, VIH-2, etc.) cuyas secuencias se han publicado en los artículos Wain-Hobson *et al.* (1985); Ratner *et al.* (1985); Sanchez-Pescador *et al.* (1985); Guyader *et al.* (1987) pertenece también a la invención. Preferentemente, el antígeno gag a detectar es la proteína P25 del VIH-1 o la P26 del VIH-2 y los anticuerpos anti-gag buscados son dirigidos contra estas proteínas. Siempre preferentemente, los antígenos de envoltura para detectar los anticuerpos anti-envoltura del VIH-1 y del VIH-2 son la gp41 del VIH-1 y la gp36 del VIH-2.

Similarmente, la detección de antígeno NS1, descrita por Alcon *et al.*, (2002) simultáneamente a la del anticuerpo anti-NS1, incluso también de anticuerpos anti-NS2, NS3 y/o S4 del virus del dengue también pertenece a la invención.

Las técnicas de aplicación son bien conocidas por el experto en la materia.

De manera preferida, puesto que es más práctico, los antígenos de captura y/o de detección, son péptidos sintéticos producidos por las técnicas estándares bien conocidas por el experto en la materia. Se puede citar como ejemplo la síntesis de tipo Merrifield que es ventajosa por razones de pureza, de especificidad antigénica, de ausencia de producto secundarios no deseados y por su facilidad de realización (Merrifield, (1963); R.C.Sheppard (1971); Atherton *et al.* (1989)). Como sintetizador automático, se puede utilizar el sintetizador "9050 Plus Pep Synthesizer" de Millipore, el sintetizador "Pioneer" de Perseptive, el sintetizador "433A" de ABI (Applied Biosystems Inc.) o el sintetizador "Symphony" de Rainin. Los péptidos pueden también ser obtenidos por síntesis en fase homogénea.

La destrucción de los epítomos sobre estos antígenos de captura y/o de detección, se puede realizar de diversas maneras. La única condición requerida para esta modificación de los sitios epitópicos es que el antígeno de captura, y/o de detección, no pueda unirse al anticuerpo de captura, y/o al anticuerpo de detección, y conservar al mismo tiempo sustancialmente la capacidad de unir los anticuerpos dirigidos contra el microorganismo, en particular unos anticuerpos anti-VHC o anti-VIH, eventualmente presentes en la muestra biológica.

Una modificación de al menos un aminoácido, preferentemente dos aminoácidos, en cada sitio epitópico pretendido, puede bastar para destruir el epítomo, sin por ello desestabilizar los otros epítomos no modificados. Tal modificación se puede obtener en particular mediante una sustitución de aminoácido, por ejemplo sustituyendo un residuo no-glicina por un residuo de glicina o alanina, o sustituyendo un aminoácido de una clase por un aminoácido de otra clase. Se puede sustituir, por ejemplo, un aminoácido de cadena lateral polar (tal como la asparagina, la glutamina, la serina, la treonina y la tirosina) por un aminoácido de cadena lateral no polar (tal como la glicina, la alantina, la valina, la leucina, la isoleucina, la fenilalanina, la metionina, el triptofano y la cisteína), y viceversa. Se puede sustituir igualmente un aminoácido de cadena lateral básica (tal como la lisina, la arginina y la histidina) por un aminoácido de cadena lateral ácida (tal como el ácido aspártico y el ácido glutámico), y viceversa, o también sustituir un aminoácido cuya cadena lateral lleva un ciclo (por ejemplo la tirosina, la fenilalanina) por un aminoácido de cadena lateral lineal, y viceversa. Una delección de uno o varios aminoácidos, o una inserción de uno o varios aminoácidos, en particular de aminoácidos no naturales, en el epítomo, permite asimismo destruir el epítomo. Asimismo, son posibles unas modificaciones de los grupos funcionales de los aminoácidos, a saber en particular los grupos OH, NH₂ o SH.

Entre los péptidos útiles en el ámbito de la presente invención, se pueden concebir unos derivados de cualquier tipo de microorganismos infecciosos (como los virus, tales como por ejemplo los virus responsables de las diversas hepatitis, los retrovirus, en particular los retrovirus responsables del SIDA (VIH-1, VIH-2, etc.), el virus CMV, los virus del dengue, así como las bacterias, los parásitos microbianos, etc.) para los cuales es deseable una detección simultánea de antígenos y de anticuerpos.

En particular, y a título de ilustración y no exclusivo, se pueden citar en particular los péptidos de la cápside del VHC, más particularmente los que van de los aminoácidos 1 a 75, 6 a 68 y 1 a 53. Estas secuencias, que corresponden a secuencias consenso del genotipo 1 (subtipo 1a, 1b, 1c) están presentados en la lista de secuencias anexa y designadas respectivamente SEC ID nº 1, nº 2 y nº 3:

SEC ID nº 1:

¹MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPR_{L44}GVR₄₇ATRKTSERSQPRGRRQPI
PKARRPEGRS₇₅

5

SEC ID nº 2:

⁶KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPR_{L44}GVR₄₇ATRKTSERSQPRGRRQPIPKA₆₈

10

SEC ID nº 3:

¹MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPR_{L44}GVR₄₇ATRKTS₅₃

15

De la misma manera, un péptido o polipéptido útil en el ámbito de la presente invención es un polipéptido gag o de envoltura de un VIH.

Se trata en particular de un péptido que corresponde a la secuencia consenso de la proteína P25 del VIH-1 cuya secuencia está designada por el identificador de secuencia SEC ID nº 23 en el listado de secuencias anexo.

20

SEC ID nº 23:

²⁹³FRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANPDCKTILKALGPAATLEEMMTAC₃₅₀

25

Puede tratarse asimismo de un péptido que comprende un epítipo de la gp41 de un VIH-1, en particular un péptido de secuencia SEC ID nº 26 a SEC ID nº31:

SEC ID nº 26: LGLWGCSGKLIC,

30

SEC ID nº 27:LGIWGCSGKLIC,

SEC ID nº 28: LGLWGCSGKHIC,

SEC ID nº 29: LGMWGCSGKHIC

35

SEC ID nº 30: RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLIC

SEC ID nº 31: RILAVERYLKDQQLLGIWGSGKLICTTAVPWNAS.

40

La utilización de un polipéptido gag o de una envoltura de un VIH-2 como antígeno de captura y/o de detección pertenece asimismo a la presente invención. Se trata en particular de un polipéptido de la gp36, de secuencia SEC ID nº 32 o SEC ID nº 33 tal como a continuación:

SEC ID nº 32: LNSWGCAFRQVC,

45

SEC ID nº 33: RVTAIEKYLQDQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVNDS.

Puede también tratarse de un polipéptido de la proteína P26 de un VIH-2, por ejemplo un polipéptido de secuencia homóloga a la del polipéptido de la proteína P25 descrita por el identificador de secuencia SEC ID nº 23.

50

Pertenecen asimismo a la invención los péptidos o polipéptidos modificados, útiles como antígenos de captura, y/o de detección. Se trata en particular de fragmentos peptídicos de la cápside, que llevan al menos un sitio epitópico modificado. Un objeto de la invención es por lo tanto un péptido o polipéptido procedente de la proteína de la cápside del VHC, que tiene al menos un sitio epitópico intacto y al menos un sitio epitópico destruido, volviéndose dicho sitio epitópico destruido así, incapaz de ser reconocido por un anticuerpo anti-cápside. Unos péptidos preferidos presentan una sustitución de dos, tres o cuatro aminoácidos, en particular en la parte constituida por los aminoácidos 20 a 40 y en la parte constituida por los aminoácidos 44 a 47. Las mutaciones siguientes son particularmente interesantes y preferidas:

55

- sustitución de los aminoácidos 34, 44 y 47 por unos residuos glicina (secuencia SEC ID nº 4, péptido designado «Cap 1-75 (G34-G44-G47)»):

60

SEC ID nº 4: Cap 1-75 (G34-G44-G47)

65

¹MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTSERSQPRGRRQP
IPKARRPEGRS₇₅

ES 2 433 920 T3

- 5 - sustitución de los aminoácidos 31, 44, y 47 por unos residuos glicina (secuencia SEC ID nº 5, péptido designado «Cap 1-75 (G31-G44-G47)»);
- SEC ID nº 5: Cap 1-75 (G31-G44-G47)
- 1MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIG₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTSERSQPRGRRQP
IPKARRPEGRS₇₅
- 10 - sustitución de los aminoácidos 36, 44, y 47 por unos residuos glicina (secuencia SEC ID nº 6, péptido designado «Cap 1-75 (G36-G44-G47)»);
- SEC ID nº 6: Cap 1-75 (G36-G44-G47)
- 1MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YG₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTSERSQPRGRRQP
IPKARRPEGRS₇₅
- 15 - sustitución de los aminoácidos 34, 44, y 47 por unos residuos glicina (secuencia SEC ID nº 7, péptido designado «Cap 6-68 (G34-G44-G47)»);
- SEC ID nº 7: Cap 6-68 (G34-G44-G47)
- 6KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTSERSQPRGRRQPIPKA₆₈
- 20 - sustitución de los aminoácidos 31, 44, y 47 por unos residuos glicina (secuencia SEC ID nº 8, péptido designado «Cap 6-68 (G31-G44-G47)»);
- SEC ID nº 8: Cap 6-68 (G31-G44-G47)
- 6KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIG₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTSERSQPRGRRQPIPKA₆₈
- 25 - sustitución de los aminoácidos 36, 44, y 47 por unos residuos glicina (secuencia SEC ID nº 9, péptido designado «Cap 6-68 (G36-G44-G47)»);
- SEC ID nº 9: Cap 6-68 (G36-G44-G47)
- 6KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YG₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTSERSQPRGRRQPIPKAR
RPEGRS₇₅
- 30 - sustitución de los aminoácidos 34, 44, y 47 por unos residuos glicina (secuencia SEC ID nº 10, péptido designado «Cap 1-53 (G34-G44-G47)»);
- SEC ID nº 10: Cap 1-53 (G34-G44-G47)
- 1MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTS₅₃
- 35 - sustitución de los aminoácidos 31, 44, y 47 por unos residuos glicina (secuencia SEC ID nº 11, péptido designado «Cap 1-53 (G31-G44-G47)»);
- SEC ID nº 11: Cap 1-53 (G31-G44-G47)
- 1MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIG₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTS₅₃
- 40 - sustitución de los aminoácidos 36, 44, y 47 por unos residuos glicina (secuencia SEC ID nº 12, péptido designado «Cap 1-53 (G36-G44-G47)»);
- SEC ID nº 12: Cap 1-53 (G36-G44-G47)
- 1MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YG₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTS₅₃
- 45 - delección de los aminoácidos 45, y 46:
- SEC ID nº 13: Cap 1-75 (G34-del(45-46))
- 1MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄YL₃₆LPRRGPR₄₄R₄₇ATRKTSERSQPRGRRQPIPK
ARRPEGRS₇₅

- modificación de la longitud del esqueleto:

SEC ID nº 14: Cap 1-75 (G34-βA45)

5 ₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄YL₃₆LPRRGPR_{L44}βA₄₅VR₄₇ATRKTSERSQPRGRR
QPIPKARRPEGRS₇₅

en la que βA representa la β-alanina

- modificación de la longitud del esqueleto por inserción de aminoácido y mutaciones:

SEC ID nº 15: Cap 1-75 (G34-G46-G46')

15 ₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄YL₃₆LPRRGPR_{L44}G₄₅G₄₆G₄₆R₄₇ATRKTSERSQPRG
RRQPIPKARRPEGRS₇₅

- inversión de polaridad:

SEC ID nº 16: Cap 1-75 (nL29-G30-G44-G47)

20 ₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGnL₂₉G₃₀V₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTSERSQPRGR
RQPIPKARRPEGRS₇₅

en la que nL representa la norLeucina

- sustitución de aminoácidos

SEC ID nº 17: Cap 1-75 (G34-F35-G44-G47)

30 ₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄F₃₅L₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTSERSQPRGRRQ
PIPKARRPEGRS₇₅

- sustitución de aminoácidos

35 SEC ID nº 18: Cap 1-75 (G34-hS35-G44-G47)

₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄hS₃₅L₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇ATRKTSERSQPRGRR
QPIPKARRPEGRS₇₅

40 en la que hS representa la homoSerina

La invención se refiere asimismo a un péptido o polipéptido procedente de una proteína gag de un VIH, que lleva al menos un sitio epitópico intacto y al menos un sitio epitópico destruido, volviéndose dicho sitio epitópico destruido así, incapaz de ser reconocido por un anticuerpo dirigido contra la misma proteína gag. Más particularmente, dicho polipéptido comprende una secuencia consenso de la proteína P25 del VIH-1 y puede presentar una sustitución de uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos, en particular en la parte constituida por los aminoácidos 293 a 322. Preferentemente, dicho polipéptido modificado presenta la secuencia consenso de la proteína P25 del VIH-1 (M) en la que los aminoácidos 295, 298, 310 y 312 se sustituyeron por un residuo glicina, y el aminoácido 316 por un residuo fenilalanina:

50 ₂₉₃FRGYVGRFYKTLRAEQAGQGVKNFMTETLLVQNPDPCKTILKALGPAATL EEMMTAC350 (SEC ID nº 22)

55 Durante la utilización de estas secuencias peptídicas, puede ser ventajoso añadir en posición N-terminal los aminoácidos C-G-G- (es decir *Cys-Gly-Gly*-) a fin de poder más fácilmente engancharles a un soporte o a cualquier molécula de interés. El péptido C-G-G-Cap 1-75 (G34-G44-G47) es particularmente ventajoso para ello.

Procedimientos de detección

60 La invención proporciona de manera general un procedimiento de detección *in vitro* de una infección por un microorganismo en una muestra biológica, que comprende la detección simultánea de un antígeno de dicho microorganismo y de un anticuerpo dirigido contra dicho microorganismo, presente en una muestra biológica, siendo dicho procedimiento tal como se define en la reivindicación 1.

65 Se entiende que el procedimiento de la invención no está restringido a la utilización de una sola pareja anticuerpo/antígeno. Se puede realizar utilizando varios anticuerpos de captura diferentes, y varios antígenos de captura diferentes.

En particular, la invención proporciona por lo tanto un procedimiento de detección *in vitro* de una infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica, que comprende la detección simultánea de un antígeno del VHC y de un anticuerpo anti-VHC, dirigido contra dicho antígeno del VHC, presentes en una muestra biológica, procedimiento que comprende

a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo de captura anti-VHC y un antígeno de captura del VHC;

b) incubar la mezcla en condiciones que permiten la formación de complejos antígenos-anticuerpos;

c) revelar los complejos antígenos-anticuerpos formados, que utilizan un anticuerpo de detección, marcado, capaz de unirse al antígeno del VHC capturado, y/o eventualmente un antígeno de detección, marcado, capaz de unirse al anticuerpo anti-VHC capturado;

y en el que el antígeno de captura del VHC comprende, o es, un fragmento antigénico del VHC del cual al menos un epítipo está destruido;

y el anticuerpo de captura y/o de detección reconoce dicho al menos un epítipo, intacto, del antígeno capturado.

La invención proporciona además un procedimiento de detección *in vitro* de una infección por un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en una muestra biológica, que comprende la detección simultánea de un antígeno de un VIH y de un anticuerpo anti-VIH, dirigido contra dicho antígeno del VIH, presente en una muestra biológica, procedimiento que comprende

a) disponer la muestra biológica con un anticuerpo de captura anti-VIH y un antígeno de captura del VIH;

b) incubar la mezcla en condiciones que permiten la formación de complejos antígenos-anticuerpos;

c) revelar los complejos antígenos-anticuerpos formados, que utilizan un anticuerpo de detección, marcado, capaz de unirse al antígeno del VIH capturado, y/o eventualmente un antígeno de detección, marcado, capaz de unirse al anticuerpo anti-VIH capturado;

y en el que el antígeno de captura del VIH comprende, o es, un fragmento antigénico del VIH del cual al menos un epítipo está destruido;

y el anticuerpo de captura y/o de detección reconoce dicho al menos un epítipo, intacto, del antígeno capturado.

Preferentemente, dicho procedimiento permite la detección de un VIH-1, la detección de un VIH-2 o la detección al mismo tiempo de un VIH-1 y de un VIH-2. En consecuencia, según la alternativa considerada, el antígeno de captura del VIH utilizado puede comprender o ser un antígeno de captura del VIH-1, un antígeno de captura del VIH-2, y un antígeno de captura del VIH-1 y del VIH-2, o una combinación de un antígeno de captura del VIH-1 y de un antígeno de captura del VIH-2 respectivamente.

La muestra biológica puede ser eventualmente tratada en una etapa previa, o presentada con el antígeno de captura y del anticuerpo de captura en condiciones que favorecen la exposición de los antígenos a detectar. Ventajosamente, se trata la muestra por un agente desnaturalizante, antes de la detección, y preferentemente antes de su puesta en contacto con los anticuerpos utilizados. En el caso de la detección de la cápside del VHC, o de la proteína gag de un VIH, este agente desnaturalizante puede estar constituido en particular de uno o varios detergentes de tipo no iónico, tales como, por ejemplo, el Nonidet P-40 (NP40) (etanol (terc-octilfenoxipoli(oxi)etileno)), también denominado IGEPAL CA630), o también de una disolución ácida.

Este inmunoensayo combinado se puede realizar según diversos formatos bien conocidos por el experto en la materia: en fase sólida; en una fase o en dos fases; en método de doble sándwich (sándwich para las dos detecciones de antígenos y de anticuerpos); o en método indirecto (para la detección de anticuerpos) combinada con un método sándwich (para la detección de antígeno).

Según la invención, el anticuerpo de captura y el antígeno de captura están inmovilizados en una fase sólida. Se puede utilizar, a título de ejemplos no limitativos de fase sólida, unas microplacas, en particular microplacas de poliestireno, tales como las comercializadas por la compañía Nunc, Dinamarca. Se pueden también utilizar partículas o bolas sólidas, bolas paramagnéticas, tales como las proporcionadas por Dynal o Merck-Eurolab (Francia)(bajo la marca de EstaporTM), o también unos tubos de ensayo de poliestireno o de polipropileno, etc.

Un formato de inmunoensayo de tipo sándwich entre dos anticuerpos (de captura y de detección) es particularmente

5 ventajoso para la detección de los antígenos presentes en la muestra biológica, mientras que los anticuerpos pueden ser revelados aplicando un antígeno de captura y un conjugado marcado que se fija sobre el anticuerpo (según un formato comúnmente designado como "formato indirecto"), por ejemplo la proteína A marcada o también un anticuerpo anti-inmunoglobulina, o anti-isótopo, marcado. Se puede también detectar ventajosamente los anticuerpos utilizando un antígeno de captura y un antígeno marcado que se fijan sobre el anticuerpo (según un formato designado como "sándwich antígeno-anticuerpo-antígeno" o "sándwich doble antígeno").

10 De manera general, según la invención, el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección (en particular utilizado en el caso del sándwich) se seleccionan de manera que reconozcan el antígeno diana natural a detectar, presente en la muestra biológica, en un epítipo, intacto, homólogo del epítipo destruido sobre el antígeno de captura y que no reconozcan el epítipo destruido sobre el antígeno de captura.

15 La detección simultánea de antígeno de un microorganismo y de anticuerpo dirigido contra dicho microorganismo, en particular la detección simultánea del antígeno de VHC y de los anticuerpos anti-VHC o también del antígeno de un VIH y de los anticuerpos anti-VIH, según la invención, se puede realizar en una sola etapa, a saber poniendo simultáneamente en contacto la muestra biológica, los medios de detección, tales como en particular el o los anticuerpos de detección, al mismo tiempo que el o los anticuerpos de captura y el o los antígenos de captura. En este caso, el inmunoensayo de detección del antígeno y el inmunoensayo de detección de los anticuerpos son ambos realizados preferentemente en sándwich. Alternativamente, los medios de detección, tales como en particular el o los anticuerpos de detección, pueden ser añadidos a la mezcla en una segunda fase, es decir después de que los primeros complejos antígenos-anticuerpos se hayan formado. Se habla entonces de ensayo en dos fases.

25 Como se ha descrito anteriormente, el antígeno de captura puede ser en particular un fragmento antigénico de la proteína de la cápside del VHC, en el que al menos un sitio epitópico está destruido. El antígeno de captura puede estar asimismo constituido por un fragmento antigénico de una proteína no estructural del VHC, en particular pero no exclusivamente de la NS3 o de la NS4, en la que al menos un sitio epitópico está también destruido. Finalmente, el antígeno de captura puede estar también constituido por una combinación de un fragmento antigénico de la proteína de la cápside, en el que al menos un sitio epitópico está destruido, y de un fragmento antigénico de una proteína no estructural del VHC, NS3 o NS4, en el que al menos un sitio epitópico está también destruido. Cualquier variante imaginable por el experto en la materia pertenece a la invención.

Según un modo de realización preferido de la invención, el procedimiento de detección de una infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica comprende:

- 35 a) disponer la muestra con un anticuerpo de captura del VHC y un antígeno de captura del VHC fijados sobre una fase sólida;
- b) incubar la mezcla en condiciones que permiten la formulación de complejos antígenos-anticuerpos;
- 40 c) separar la fase sólida y la fase líquida;
- d) poner en contacto la fase sólida con un anticuerpo de detección, marcado, capaz de unirse al antígeno de VHC capturado, y uno o más anticuerpos anti-inmunoglobulina, o anti-isotipo, marcado, capaz de unirse al anticuerpo ant-VHC capturado,
- 45 comprendiendo o siendo el antígeno de captura de anticuerpos anti-VHC un fragmento antigénico de la proteína de la cápside del VHC, del cual se han destruido dos epítipos,
- 50 y reconociendo los anticuerpos de captura y de detección cada uno uno de dichos epítipos, intactos, del antígeno de la cápside capturado.

Según otro modo de realización, el procedimiento de la invención permite la detección de una infección por un VIH, tal como un VIH-1 o un VIH-2. Preferentemente, dicho procedimiento comprende al mismo tiempo un antígeno de captura que deriva de un VIH-1 y un antígeno de captura que deriva de un VIH-2, a fin de poder detectar al mismo tiempo unos anticuerpos anti-VIH-1 y anti-VIH-2. Según este modo preferido, el procedimiento según la invención se puede utilizar por lo tanto indistintamente para detectar una infección por el VIH-1 y/o el VIH-2.

60 El antígeno de captura comprende como mínimo un fragmento antigénico de una proteína gag de un VIH, por ejemplo de la proteína P25 del VIH-1 o de la P26 del VIH-2, en el que al menos un sitio epitópico está destruido. El antígeno de captura puede además comprender un fragmento antigénico de una proteína de envoltura de un VIH, en particular, pero no exclusivamente, de la gp41 del VIH-1 o de la gp36 del VIH-2. Finalmente, el antígeno de captura puede estar constituido por una combinación de fragmentos antigénicos de una proteína gag del VIH-1 y del VIH-2, completada, llegado el caso, de fragmentos antigénicos de una proteína de recubrimiento del VIH-1 y del VIH-2. Cualquier variante imaginable por el experto en la materia pertenece a la invención.

Según un modo de realización preferido de la invención, el procedimiento de detección de una infección por un virus

de la inmunodeficiencia humana (VIH) en una muestra biológica comprende:

- 5 a) disponer la muestra con un anticuerpo de captura del VIH, y un antígeno de captura del VIH fijados sobre una fase sólida;
- b) incubar la mezcla en condiciones que permiten la formación de complejos antígenos-anticuerpos;
- c) separar la fase sólida y la fase líquida;
- 10 d) poner en contacto la fase sólida con un anticuerpo de detección, marcado, capaz de unirse al antígeno de VIH capturado, y uno o más anticuerpos anti-inmunoglobulina, o anti-isotipo, marcado, capaz de unirse al anticuerpo anti-VIH capturado,
- 15 comprendiendo o siendo el antígeno de captura de anticuerpos anti-VIH un fragmento antigénico de la proteína de la cápside del VIH, del cual al menos un epítipo se ha destruido,
- y reconociendo los anticuerpos de captura y de detección cada uno de dichos epítipos, intactos, del antígeno gag capturado.

20 Preferentemente, el procedimiento según la invención pretende la detección de una infección bien por VIH-1, o por VIH-2, o bien por VIH-1 y VIH-2. Según esta última alternativa, el antígeno de captura de anticuerpos anti-VIH es la combinación de un fragmento de la proteína gag de VIH-1 y de un fragmento de la proteína gag del VIH-2.

25 Las dosificaciones ELISA, el radioinmunoensayo, o cualquier otra técnica de detección se pueden utilizar para revelar la presencia de los complejos antígenos-anticuerpos formados. Un mismo tipo o varios tipos de marcadores pueden ser utilizados para detectar, por un lado, el antígeno de microorganismo infeccioso, en particular el antígeno VHC o VIH y, por otro lado, el anticuerpo dirigido contra el microorganismo infeccioso, en particular el anticuerpo anti-VHC o anti-VIH.

30 La detección de la presencia de antígenos o de anticuerpos en la muestra biológica puede ser completada por una cuantificación, por ejemplo por medición de las señales emitidas por los marcadores (color, luminiscencia, radioactividad, etc.) según las técnicas estándares bien conocidas por el experto en la materia.

35 Kits

Los kits y reactivos útiles para la detección de una infección por un microorganismo, tal como el virus de la hepatitis C (VHC) o un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en una muestra biológica, conforme al procedimiento de la invención, pueden ser proporcionados para una puesta en práctica de la invención fácil y aplicable a numerosas muestras biológicas.

40 La invención se refiere asimismo a un kit útil para la detección de una infección por un virus de la hepatitis C (VHC) o un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en una muestra biológica, que comprende:

- 45 - un antígeno de captura, inmovilizado sobre una fase sólida, que comprende un fragmento antigénico de una proteína de dicho VHC o VIH, comprendiendo dicho fragmento al menos un epítipo destruido, volviéndose incapaz de ser reconocido por un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección dirigidos contra dicho al menos un epítipo, intacto, seleccionado del grupo de los epítipos de secuencias siguientes: ⁴⁴LGVR⁴⁷ (SEC ID n° 19), ³⁰IVGGVYL³⁶ (SEC ID n° 20), ²⁹QIVGGV³⁴ (SEC ID n° 21), QASQEVKNWMTETLL (SEC ID n° 24) y QTDPAVKNWMTQTLL (SEC ID n° 25), y conservar al mismo tiempo la capacidad de unirse a los anticuerpos dirigidos contra el microorganismo eventualmente presente en la muestra biológica, por reconocimiento de otros sitios epitópicos que permanecen intactos;
- 50 - dicho anticuerpo de detección, monoclonal o policlonal mono-especificado, dirigido contra dicho al menos un epítipo, intacto, de dicha proteína del VHC o VIH; y
- 55 - dicho anticuerpo de captura monoclonal o policlonal mono-específico, inmovilizado sobre una fase sólida, dirigida contra dicho al menos un epítipo, intacto, de dicha proteína del VHC o VIH;

60 siendo dicha proteína del VHC la proteína de la cápside del VHC y el anticuerpo de captura y/o de detección que reconoce un epítipo seleccionado del grupo de epítipos de secuencias siguientes: ⁴⁴LGVR⁴⁷ (SEC ID n° 19), ⁷⁰LVGGVYL³⁶ (SEC ID n° 20) y ²⁹QIVGGV³⁴ (SEC ID n° 21), o

siendo dicha proteína del VIH la proteína P25 del VIH-1 y el anticuerpo de captura y/o de detección que reconoce el epítipo de secuencia QASQEVKNWMTETLL (SEC ID n° 24), o

65 siendo dicha proteína del VIH la proteína P26 del VIH-2 y el anticuerpo de captura y/o de detección que

reconoce el epítipo de secuencia QTDPVKNWMTQTLL (SEC ID nº 25).

De manera ventajosa, este kit puede contener varios antígenos y varios anticuerpos de captura.

5 Como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo de captura y el antígeno de captura son presentados en una forma inmovilizada en una fase sólida, tal como una microplaca.

Un kit preferido comprende

- 10 a) el antígeno de captura, que comprende, o es, un fragmento antigénico de una proteína del VHC, comprendiendo dicho fragmento al menos dos epítipos destruidos, y que conserva al mismo tiempo la capacidad de unirse a los anticuerpos anti-VHC eventualmente presentes en una muestra biológica;
- 15 b) un anticuerpo de captura dirigido contra uno de dichos epítipos, intactos, de dicha proteína del VHC; siendo dicho antígeno de captura y dicho anticuerpo de captura inmovilizados en una fase sólida;
- c1) un anticuerpo de detección, marcado, dirigido contra otro de dichos epítipos, intactos, de dicha proteína del VHC,
- 20 c2) y/o eventualmente un antígeno de detección, marcado, que comprende o que es, un fragmento antigénico de una proteína del VHC, comprendiendo dicho fragmento al menos dos epítipos destruidos, y que conserva al mismo tiempo la capacidad de unirse con los anticuerpos anti-VHC eventualmente presentes en una muestra biológica, siendo dicha proteína del VHC la proteína de la cápside y siendo dichos al menos dos epítipos,
- 25 intactos, seleccionados del grupo de epítipos de secuencias siguientes: ⁴⁴LGVR⁴⁷ (SEC ID nº 19), ³⁰IVGGVYL³⁶ (SEC ID nº 20), ²⁹QIVGGV³⁴ (SEC ID nº 21).

De manera preferida también, un kit según la invención comprende

- 30 a) el antígeno de captura, que comprende o que es un fragmento antigénico de una proteína del VIH, comprendiendo dicho fragmento al menos un epítipo destruido, y que conserva al mismo tiempo la capacidad de unirse a los anticuerpos anti-VIH eventualmente presentes en una muestra biológica;
- 35 b) un anticuerpo de captura dirigido contra uno de dichos epítipos, intactos, de dicha proteína del VIH; siendo dicho antígeno de captura y dicho anticuerpo de captura inmovilizados en una fase sólida;
- c1) un anticuerpo de detección, marcado, dirigido contra otro de dichos epítipos, intactos, de dicha proteína del VIH,
- 40 c2) eventualmente un antígeno de detección, marcado, que comprende o es, un fragmento antigénico de una proteína del VIH, comprendiendo dicho fragmento al menos dos epítipos destruidos, y que conserva al mismo tiempo la capacidad de unirse con los anticuerpos anti-VIH eventualmente presentes en una muestra biológica, siendo dicha proteína del VIH la proteína P25 del VIH-1 y teniendo, dicho al menos un epítipo,
- 45 intacto, la secuencia QASQEVKNWMTETLL (SEC ID nº 24), o siendo dicha proteína del VIH la proteína P26 del VIH-2 y teniendo dicho al menos un epítipo, intacto, secuencia QTDPVKNWMTQTLL (SEC ID nº 25).

El kit puede comprender además un medio de detección de dichos anticuerpos presentes en la muestra biológica y que forman complejos con dicho antígeno de captura, por ejemplo un anticuerpo anti-inmunoglobulina, o anti-isotipo, marcado, o también un antígeno de detección. El antígeno de detección es un fragmento antigénico de la proteína de la cápside del VHC o P25 o P26 de un VIH, que comprende al menos un epítipo destruido, y que conserva al mismo tiempo la capacidad de unirse a los anticuerpos (anti-VHC o anti-VIH) eventualmente presentes en la muestra.

El kit puede también comprender, además un detergente, más particularmente un detergente no iónico, tal como NP40 (Sigma) o cualquier detergente no iónico equivalente conocido por el experto en la materia.

Tal como se ha descrito anteriormente, el antígeno de captura, como el antígeno de detección, puede ser en particular un fragmento de la proteína de la cápside del VHC, fragmento del cual al menos un sitio epitópico está destruido, y el anticuerpo de captura y/o de detección se selecciona entonces para reconocer dicho sitio epitópico, intacto, de la proteína de la cápside.

En particular, la invención tiene por objeto un conjunto de reactivos que comprende o que está constituido de un péptido de la cápside del VHC mutado en al menos dos sitios epitópicos distintos, tal como el péptido 1-75 (G34-G44-G47), y un par de anticuerpos que no pueden reconocer el péptido 1-75 (G34-G44-G47) mientras que reconocen la secuencia nativa de VHC correspondiente.

En particular, la invención tiene por objeto un conjunto de reactivos que comprende o que está constituido de un péptido de la proteína P25 mutado en al menos un sitio epitópico distinto, tal como el péptido de secuencia SEC ID nº 22, y de una pareja de anticuerpos que no pueden reconocer el péptido de secuencia SEC ID nº 22 mientras que reconocen la secuencia nativa de la proteína P25 del VIH-1.

5

Las figuras y ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitar su alcance.

Leyenda de las figuras:

10 La figura 1 es un esquema que ilustra un procedimiento de detección del tipo de los utilizados anteriormente en la invención con, fijados sobre una fase sólida, un anticuerpo de captura y un antígeno de captura no modificado. Este esquema ilustra la competición del anticuerpo del paciente con el anticuerpo de detección frente a la unión al antígeno de captura.

15 La figura 2, por comparación, es un esquema que ilustra un modo de realización de la presente invención. Estando mutado el antígeno de captura, ya no es capaz de ser reconocido por el anticuerpo de detección. Por lo tanto ya no hay interferencia entre la detección del anticuerpo y la detección del antígeno.

Ejemplos: Detección de una infección por el virus de la hepatitis C

20

Materiales para los protocolos 1a y 1b:

25 Conjugado anticuerpo monoclonal anti-cápside-peroxidasa ("acm-POD"): un conjugado del anticuerpo monoclonal anti-cápside, Acm 2 (véase la tabla 1), marcado con peroxidasa se prepara según el protocolo descrito en la solicitud de patente EP 0 752 102. Este conjugado Acm2 marcado con peroxidasa se diluye en el diluyente de la 1ª etapa (descrita a continuación) a fin de permitir la obtención *in fine*, con una muestra positiva bien documentada, una densidad óptica elevada (superior, por ejemplo, a 1,5 unidades), y esto en condiciones bien conocidas por el experto en la materia.

30 Otro anticuerpo monoclonal anti-cápside, Acm 1 (véase la tabla 1) es asimismo utilizado para ser inmovilizado sobre la fase sólida (véase a continuación).

Materiales para el protocolo 1c:

35 Conjugados anticuerpos monoclonal anti-cápside-peroxidasa ("acm-POD"): un conjugado del anticuerpo monoclonal anti-cápside, Acm 1 (véase la tabla 1), marcado con peroxidasa se prepara según el protocolo descrito en la solicitud de patente EP 0 752 102. Este conjugado anticuerpo Acm1 marcado con peroxidasa se diluye en el diluyente de la 1ª etapa (descrita a continuación) a fin de permitir obtener *in fine*, con una muestra positiva bien documentada, una densidad óptica elevada (superior, por ejemplo, a 1,5 unidades), y esto en condiciones bien conocidas por el experto en la materia.

Otro anticuerpo monoclonal anti-cápside, el anticuerpo monoclonal anticápside Acm3 (véase la tabla 1), se utiliza también para ser inmovilizado en la fase sólida (véase a continuación).

45 Materiales para el protocolo 1d:

1) conjugado anticuerpo monoclonal anti-cápside-biotina: se prepara un conjugado del anticuerpo monoclonal anti-cápside, Acm 5 (véase la tabla 1), marcado con biotina, según el protocolo descrito por Greg T. Hermanson en 1996. Este anticuerpo Acm 5 marcado con biotina se diluye en el diluyente de la 1ª etapa (véase a continuación) a fin de permitir obtener *in fine*, con una muestra positiva bien documentada, una densidad óptica elevada (superior, por ejemplo, a 1,5 unidades) y esto, en condiciones bien conocidas por el experto en la materia.

55 Otro anticuerpo monoclonal anti-cápside, el anticuerpo monoclonal anti-cápside Acm 1 (véase la tabla 1), se utiliza también para ser inmovilizado sobre la fase sólida (véase a continuación).

2) Conjugado estreptavidina marcado con peroxidasa: se prepara un conjugado de estreptavidina marcado con peroxidasa según el protocolo descrito por Greg T. Hermanson en 1996. En el momento de la realización del protocolo 1d, este conjugado de estreptavidina marcado con peroxidasa se diluye en el diluyente de la 2ª etapa (descrita a continuación) a fin de permitir obtener *in fine*, con una muestra positiva bien documentada, una densidad óptica elevada (superior, por ejemplo, a 1,5 unidades) y esto, en condiciones bien conocidas por el experto en la materia.

60

Materiales comunes para los protocolos 1a, 1b, 1c y 1d:

1) fase sólida seleccionada: microplaca Maxisorp, Nunc (Dinamarca).

5 2) diluyentes de las 1ª y 2ª etapas de los protocolos según la invención:

Diluyente de la 1ª etapa: tampón Tris, NaCl 0,05M, a pH 6,7 adicionado de NP40 ((terc-Octilfenoxi-poli(oxietil)etanol - IGEPAL CA 630, Sigma) al 0,25%.

10 Diluyente de la 2ª etapa: Tampón citrato (50 mM), a pH 6,7, glicerolado al 20%, que contiene un conjugado anticuerpo policlonal de ratón anti-IgG (Fc) humanas marcado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA) con una dilución que permite obtener *in fine*, con una muestra positiva bien documentada, una densidad óptica elevada (superior, por ejemplo, a 1,5 unidades) y esto, en condiciones bien conocidas por el experto en la materia.

15 3) Solución de revelación: la solución de revelación está compuesta

3a) de un tampón sustrato: solución de ácido cítrico (0,075 M) y de acetato de sodio (0,1 M), a pH 4,0, que contiene H₂O₂ al 0,015% y dimetilsulfóxido (DMSO)(PROLABO) al 4%, y

20 3b) de un reactivo cromógeno: tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) a 0,7 mM en concentración final en el tampón sustrato.

25 4) solución de parada: H₂SO₄ 1N.

Métodos:

30 Protocolo 1a: protocolo de detección simultánea del antígeno cápside y de los anticuerpos (anti-cápside y anti-NS3, NS4) del virus de la hepatitis C en una muestra (suero o plasma)

El principio del ensayo se basa en un método inmunoenzimático de tipo sándwich para la detección del antígeno, y de tipo indirecto para la detección de los anticuerpos.

Se basa en las etapas siguientes:

35 Se realiza en primer lugar una solución de sensibilización

* con una mezcla de antígenos VHC: un método mutado C-G-G-Cap 1-75 (G34-G44-G47) (cápside) que comprende la secuencia SEC ID nº 4 y dos proteínas recombinadas producidas por *Escherichia coli* a partir de clones seleccionados en las regiones no estructurales NS3 (clon NS3.1: AA 1192-1492), y NS4 (clon 5-1-1: AA 1694-1735), y

* con un anticuerpo monoclonal anti-cápside (Acm 1),

45 en tampón Tris 0,5, pH 7,4.

Las cúpulas de una placa de microtitración (Nunc, Maxisorp) son entonces sensibilizadas con la solución anterior a razón de 100 µl por cúpula.

50 Las placas de microtitración se ponen a incubar durante una noche a temperatura ambiente (18-24°C).

Después de la eliminación de la solución de sensibilización, las placas se lavan con la ayuda de un tampón fosfato (0,01, pH 7,4) que contiene 0,1% de Tween 20, y después se saturan mediante la adición de un tampón fosfato (0,01 M, pH 7) que contiene 5% de sacarosa, 25% de leche desnatada (CandiaTM, Francia, o cualquier otra leche desnatada equivalente del comercio) y 10 mM de EDTA.

55 En cada cúpula, se distribuye sucesivamente 100 µl de diluyente de 1ª etapa, que contiene el anticuerpo monoclonal anti-cápside Acm 2 marcado con peroxidasa, y después 50 µl de muestra (suero o plasma).

60 El medio de reacción se pone a incubar a 37°C durante 1,5 horas. Los antígenos de la cápside del VHC eventualmente presentes se unen al anticuerpo monoclonal de la fase sólida Acm 1 y al anticuerpo monoclonal anti-cápside Acm 2 marcado con peroxidasa, formando así unos complejos sándwich con estos dos anticuerpos. Asimismo, si unos anticuerpos anti-VHC están presentes, estos se unen a los antígenos fijados sobre la fase sólida.

65 Las placas son después lavadas (3 veces) con la ayuda de una disolución de lavado (tampón Tris NaCl 0,01 M,

pH 7,4, adicionado de Tween 20 al 0,1%).

En cada cúpula se distribuyen 100 µl de diluyente de 2ª etapa, que contienen los anticuerpos anti-IgG humanas marcadas con peroxidasa. El medio de reacción se pone a incubar a temperatura ambiente (18-24°C) durante 30 minutos. Los anticuerpos anti-IgG humanos marcados se fijan a su vez a los anticuerpos específicos retenidos sobre la fase sólida.

Se lavan después las placas (5 veces) con la ayuda de una solución de lavado (tampón Tris NaCl 0,01 M, pH 7,4, adicionado de Tween 20 al 0,1%). El conjugado anti-IgG humano no unido es así eliminado.

En cada cúpula, se distribuyen 100 µl de la solución de revelación. La reacción se deja desarrollar en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-24°C).

Después, se distribuyen 100 µl de solución de parada en cada cúpula.

Después de la parada de la reacción, la lectura de la densidad óptica se efectúa con el espectrofotómetro de 450/620 nm.

Definición del valor límite:

El valor límite se ha determinado después del análisis estadístico de los datos de especificidad y sensibilidad de la curva de ROC (Receiver Operating Characteristic)(Berck y Schultz, (1986)).

El estudio de especificidad se realizó sobre 1000 muestra de sujetos sanos, y el estudio sobre 200 muestras VHC positivas (en particular principios de seroconversión) de paneles comerciales: BBI (Boston Biomedica Company, USA), Impath (USA), Serologicals (USA), Nabi (USA), ProMedDx (USA)).

El valor límite se calcula para cada placa a partir de la señal obtenida sobre un control positivo, dividido por un coeficiente X, constante, específico del ensayo. Es de aproximadamente 0,280 unidades de DO (densidad óptica) en los ejemplos presentados.

Como se puede constatar en este protocolo, contrariamente a algunas técnicas de la técnica anterior, la captura del antígeno de la cápside y la de los anticuerpos anti-cápside se hace, en la presente invención, en una sola y misma zona proteica de la cápside: la zona antigénica que captura los anticuerpos anti-cápside (AA 1-75) incluye la zona de especificidad antigénica (AA 44-47) por la cual el anticuerpo anti-cápside inmovilizado (acm1) captura el antígeno de la cápside. Así, según la invención, la pérdida de detección de un cierto número de anticuerpos anti-cápside es reducida al mínimo y la sensibilidad se encuentra mejorada.

Protocolo 1b: Protocolo de detección simultánea de antígeno cápside y de anticuerpos (anti NS3 y NS4) del virus de la hepatitis C en una muestra (suero o plasma)

El principio del ensayo se basa en un método inmunoenzimático de tipo sándwich para la detección del antígeno, y de tipo indirecto para la detección de los anticuerpos.

Se basa en las etapas siguientes:

Se realiza en primer lugar una solución de sensibilización

* con una mezcla de antígenos VHC: dos proteínas recombinadas producidas por *Escherichia coli* a partir de clones seleccionados en las regiones no estructurales NS3 (clon NS3.1: AA 1192-1492), y NS4 (clon 5-1-1: AA 1694-1735), y

* con un anticuerpo monoclonal anti-cápside (Acm 1),

en tampón Tris 0,5, pH 7,4.

Las cúpulas de una placa de microtitración (Nunc, Maxisorp) son entonces sensibilizadas con la solución anterior a razón de 110 µl por cúpula.

La etapas siguientes son idénticas a las del protocolo 1a.

Protocolo 1c: Protocolo de detección simultánea de antígeno cápside y de anticuerpos (anti-cápside y anti NS3 y NS4) del virus de la hepatitis C en una muestra (suero o plasma)

El principio del ensayo se basa en un método inmunoenzimático de tipo sándwich para la detección del antígeno, y de tipo indirecto para la detección de los anticuerpos.

Se basa en las etapas siguientes:

- 5 Se realiza en primer lugar una solución de sensibilización
- * con una mezcla de antígenos VHC: un péptido mutado C-G-G-Cap 1-75 (G31-G44-G47) (cápside) que comprende la secuencia SEC ID nº 5 o el péptido mutado C-G-G-Cap 1-53 (G31-G44-G47) que comprende la secuencia SEC ID nº 11 o el péptido mutado C-G-G-Cap 6-68 (G31-G44-G47) que comprende la secuencia SEC ID nº 8 y dos proteínas recombinadas producidas por *Escherichia coli* a partir de clones seleccionados en las regiones no estructurales NS3 (clon NS3.1: AA 1192-1492), y NS4 (clon 5-1-1: AA 1694-1735), y
- 10 * con un anticuerpo monoclonal anti-cápside (Acm 3),
- en tampón Tris 0,5, pH 7,4.
- 15 Las cúpulas de una placa de microtitración (Nunc, Maxisorp) son entonces sensibilizadas con la solución anterior a razón de 110 µl por cúpula.
- Las placas de microtitración se ponen a incubar durante una noche a temperatura ambiente (18-24°C).
- 20 Después de la eliminación de la solución de sensibilización, las placas se lavan con la ayuda de un tampón fosfato (0,01, pH 7,4) que contiene el 0,1% de Tween 20, y después se saturan mediante la adición de un tampón fosfato (0,01 M, pH 7) que contiene el 5% de sacarosa, el 25% de leche desnatada (Candia™, Francia, o cualquier otra leche desnatada equivalente del comercio) y 10 mM de EDTA.
- 25 En cada cúpula, se distribuye sucesivamente 100 µl de diluyente de 1ª etapa, que contiene el anticuerpo monoclonal anti-cápside Acm 1 marcado con peroxidasa, y después 50 µl de muestra (suero o plasma).
- 30 El medio de reacción se pone a incubar a 37°C durante 1,5 horas. Los antígenos de la cápside del VHC eventualmente presentes se unen al anticuerpo monoclonal de la fase sólida Acm 3 y al anticuerpo monoclonal anti-cápside Acm 1 marcado con peroxidasa, formando así unos complejos sándwich con estos dos anticuerpos. Asimismo, si unos anticuerpos anti-VHC están presentes, estos se unen a los antígenos fijados sobre la fase sólida.
- 35 Las etapas siguientes son idénticas a las del protocolo 1a.
- Como se puede constatar también aquí, asimismo, la captura del antígeno de la cápside y la de los anticuerpos anti-cápside se hace, en la presente invención, sobre una sola y misma zona proteica de la cápside: la zona antigénica que captura los anticuerpos anti-cápside (AA 1-75) incluye la zona de especificidad antigénica (AA 29-34) por la cual el anticuerpo anti-cápside inmovilizado (acm 3) captura el antígeno de la cápside. Así, según la invención, la pérdida de detección de un cierto número de anticuerpos anti-cápside está reducida al mínimo y la sensibilidad se encuentra mejorada.
- 40
- Protocolo 1d: Protocolo de detección simultánea de antígeno cápside y de anticuerpos (anti-cápside y anti NS3 y NS4) del virus de la hepatitis C en una muestra (suero o plasma)
- 45 El principio del ensayo se basa en un método inmunoenzimático de tipo sándwich para la detección del antígeno, y de tipo indirecto para la detección de los anticuerpos.
- 50 Se basa en las etapas siguientes:
- Se realiza en primer lugar una solución de sensibilización
- * con una mezcla de antígenos VHC: un péptido mutado C-G-G-Cap 1-75 (G34-G44-G47) (cápside) que comprende la secuencia SEC ID nº 4 o el péptido mutado C-G-G-Cap 1-75 (G34-G46-G46) que comprende la secuencia SEC ID nº 15 o el péptido mutado C-G-G-Cap 1-75 (G34-βA45) que comprende la secuencia SEC ID nº 14 y dos proteínas recombinadas producidas por *Escherichia coli* a partir de clones seleccionados en las regiones no estructurales NS3 (clon NS3.1: AA 1192-1492), y NS4 (clon 5-1-1: AA 1694-1735), y
- 55 * con un anticuerpo monoclonal anti-cápside (Acm 1),
- en tampón Tris 0,5, pH 7,4.
- Las cúpulas de una placa de microtitración (Nunc, Maxisorp) son entonces sensibilizadas con la solución anterior a razón de 110 µl por cúpula.
- 65

Las placas de microtitración se ponen a incubar durante una noche a temperatura ambiente (18-24°C).

5 Después de la eliminación de la solución de sensibilización, las placas se lavan con la ayuda de un tampón fosfato (0,01, pH 7,4) que contiene el 0,1% de Tween 20, y después se saturan mediante la adición de un tampón fosfato (0,01 M, pH 7) que contiene el 5% de sacarosa, el 25% de leche desnatada (Candia™, Francia, o cualquier otra leche desnatada equivalente del comercio) y 10 mM de EDTA.

10 En cada cúpula, se distribuye sucesivamente 100 µl de diluyente de 1ª etapa, que contiene el anticuerpo monoclonal anti-cápside Acm 5 marcado con biotina, y después 50 µl de muestra (suero o plasma).

El medio de reacción se pone a incubar a 37°C durante 1,5 horas.

15 Los antígenos de cápside del VHC eventualmente presentes se unen al anticuerpo monoclonal de la fase sólida Acm 1 y al anticuerpo monoclonal anti-cápside Acm 5 marcado con biotina, formando así unos complejos sándwich con estos dos anticuerpos.

20 Asimismo, si unos anticuerpos anti-VHC están presentes, estos se unen a los antígenos fijados sobre la fase sólida.

Después, las placas se lavan (3 veces) con la ayuda de una solución de lavado (tampón Tris NaCl 0,01 M, pH 7,4, adicionado de Tween 20 al 0,1%).

25 En cada cúpula, se distribuyen 100 µl de diluyente de 2ª etapa, que contienen los anticuerpos anti-IgG humanos marcados con la peroxidasa y la estreptavidina marcada con peroxidasa. El medio de reacción se pone a incubar a temperatura ambiente (18-24°C) durante 30 minutos. Los anticuerpos anti-IgG humanos marcados se fijan a su vez a los anticuerpos específicos retenidos sobre la fase sólida y la estreptavidina marcada con peroxidasa se fija al anticuerpo Acm 5 biotinilado retenido en la misma fase sólida.

30 Las etapas siguientes son idénticas a las del protocolo 1a.

35 Como se puede constatar también aquí, asimismo, la captura del antígeno de la cápside y la de los anticuerpos anti-cápside se hace, en la presente invención, sobre una sola y misma zona proteica de la cápside: la zona antigénica que captura los anticuerpos anti-cápside (AA 1-75) incluye la zona de especificidad antigénica (AA 44-47) por la cual el anticuerpo anti-cápside inmovilizado (acm 1) captura el antígeno de la cápside. Así, según la invención, la pérdida de detección de un cierto número de anticuerpos anti-cápside es reducida al mínimo y la sensibilidad se encuentra mejorada.

40 **Ejemplo 1: Detección de antígeno cápside del VHC en una muestra (suero o plasma) durante la ventana serológica**

Se han ensayado unas muestras séricas o plasmáticas, extraídas en pacientes contaminados por VHC y reunidas en paneles comerciales (Impath, USA), negativas en detección anticuerpo y positivas en ácido nucleico (PCR) según el método descrito en el protocolo 1a.

45 Los resultados señalados en la tabla 2 son comparados con resultados obtenidos en PCR

Tabla 2:

Muestra Impath	Densidad óptica	Interpretación	Ensayo anticuerpos	Ensayo PCR
1866	0,616	Positiva	Negativo	Positivo
1883 (1/2)*	0,661	Positiva	Negativo	Positivo
1889 (1/2)*	0,671	Positiva	Negativo	Positivo
1999 (1/2)*	0,596	Positiva	Negativo	Positivo
2028 (1/2)*	0,520	Positiva	Negativo	Positivo
2144(1/2)*	0,674	Positiva	Negativo	Positivo

2145 (1/2)*	0,808	Positiva	Negativo	Positivo
2159	0,547	Positiva	Negativo	Positivo
1959	0.512	Positiva	Negativo	Positivo

*: dilución

5 Se constata que los resultados obtenidos mediante el método según la invención están directamente correlacionados con los resultados obtenidos en PCR. La invención descrita permite por lo tanto detectar los antígenos de la cápside mientras que los anticuerpos no están aún presentes, es decir en muestras extraídas en la ventana serológica.

10 **Ejemplo 2: Detección de anticuerpos anti-cápside en muestras (sueros o plasmas) negativas en antígeno VHC**

15 Se han ensayado unas muestras séricas o plasmáticas, extraídas en pacientes contaminados por VHC y reunidas en paneles internos y comerciales, positivas en anticuerpos (cápside) y negativas en antígeno (cápside), según los métodos descritos en el protocolo 1a y 1b.

En ausencia del péptido 1-75 (G34-G44-G47) (que comprende la SEC ID nº 4) sobre la fase sólido (protocolo 1b), las muestras ensayadas (específicas de la cápside) no son detectadas, mientras que se encuentran positivas con el protocolo 1a y en un ensayo de anticuerpos clásico (véase la tabla 3).

20 Tabla 3:

Muestra	Densidad óptica		Interpretación		Ensayo Anticuerpos
	1a	1b	1a	1b	
16	0,942	0,092	Positiva	Negativa	Positivo
38	0,409	0,041	Positiva	Negativa	Positivo
49	3,246	0,080	Positiva	Negativa	Positivo
KJ9-1102-0025	0,916	0,054	Positiva	Negativa	Positivo

25 La invención permite por lo tanto detectar en sujetos contaminados por el VHC unas muestras positivas en anticuerpos anti-cápside, y negativas en antígeno capsídico.

30 **Ejemplo 3: detección simultánea de antígeno capsídico y de anticuerpos anti-VHC en una muestra (suero o plasma)**

Se han ensayado dos paneles de muestras de seroconversión PHV 907 y PHV 917 (es decir dos series de sueros o plasmas, extraídos en dos pacientes después de la infección por el VHC o en curso de seroconversión) Comercializados por BBI (Boston Biomedica Company, USA), según el protocolo 1 a (véanse las tablas 4 y 5).

35 Tabla 4:

Muestra BBI	Día de extracción	Densidad óptica	Interpretación	Ensayo anticuerpo	Ensayo PCR
907-1	0	0,482	Positiva	Negativo	Positivo
907-2	+ 4	0,344	Positiva	Negativo	Positivo
907-3	+ 7	0,325	Positiva	Negativo	Positivo
907-4	+ 13	0,318	Positiva	Negativo	Positivo
907-5	+ 18	0,395	Positiva	Negativo	Positivo
907-6	+ 21	0,855	Positiva	Positivo	Positivo
907-7	+ 164	2,991	Positiva	Positivo	Positivo

Tabla 5:

Muestra BBI	Día de extracción	Densidad óptica	Interpretación	Ensayo anticuerpo	Ensayo PCR
917-1	0	0,045	Negativa	Negativo	Negativo
917-2	13	0,803	Positiva	Negativo	Positivo
917-3	20	0,324	Positiva	Negativo	Positivo
917-4	22	0,448	Positiva	Negativo	Positivo
917-5	85	2,652	Positiva	Positivo	Negativo
917-6	131	2,582	Positiva	Positivo	Negativo

917-7	135	2,720	Positiva	Positivo	Positivo
917-8	138	2,736	Positiva	Positivo	Negativo
917-9	146	3,023	Positiva	Positivo	Negativo
917-10	152	3,033	Positiva	Positivo	Negativo

En las tablas 4 y 5, se observa, de manera correlacionada con la presencia del ARN viral (ensayo PCR), una señal positiva en antígeno con el protocolo 1a según la invención; de la misma manera, se obtiene una respuesta positiva sobre extracciones de seroconversión, positivas en anticuerpos y/o en antígeno. Esto muestra bien que las 2 detecciones (antígeno capsídico y anticuerpo anti-cápside) pueden funcionar simultáneamente en el mismo ensayo, y sin interferencia.

Además, la invención descrita presenta un interés muy particular desde un punto de vista de diagnóstico frente a la PCR, ya que permite detectar muestras negativas en PCR y positivas en anticuerpos.

Ejemplo 4: Comparación de los rendimientos de diferentes péptidos mutados sobre la detección de anticuerpos anti-cápside

Se han ensayado unas muestras séricas o plasmáticas, extraídas en pacientes contaminados por VHC y reunidas en paneles internos y comerciales, positivas en anticuerpos (cápside) y negativas en antígeno (cápside), según los métodos descritos en los protocolos 1c y 1d (véanse las tablas 6 y 7).

Tabla 6: protocolo 1c

Muestra	SEC ID nº 5 DO Interp.	SEC ID nº 11 DO Interp.	SEC ID nº 8 DO Interp.
16 (1/2)*	0,434 Pos.	0,534 Pos.	0,413 Pos.
21 (1/2)*	0,520 Pos.	0,568 Pos.	0,481 Pos.
49 (1/20)*	0,405 Pos.	0,538 Pos.	0,384 Pos.
O7	0,312 Pos.	0,340 Pos.	0,285 Pos.

*: dilución

Tabla 7: protocolo 1d

Muestra	SEC ID nº 4 DO Interp.	SEC ID nº 15 DO Interp.	SEC nº 14 DO Interp.
16 (1/2)*	0,438 Pos.	0,362 Pos.	0,327 Pos.
21 (1/4)*	0,257 Pos.	0,218 Neg.	0,197 Neg.
38 (1/2)*	0,310 Pos.	0,221 Pos.	0,206 Neg.
49 (1/40)*	0,308 Pos.	0,228 Pos.	0,201 Neg.
BCP 453(1/4)*	0,363 Pos.	0,208 Neg.	0,175 Neg.
KJ9-0025 (1/40)*	0,263 Pos.	0,237 Pos.	0,212 Neg.

*: dilución

Los péptidos mutados comparados en la tabla 6 presentan rendimientos bastante similares en las muestras ensayadas.

Por el contrario, las diferencias de respuesta entre los péptidos son más marcadas en la tabla 7. Los péptidos SEC ID nº 15 y SEC ID nº 14 no permiten detectar ciertas muestras diluidas anti-cápside, siendo las mismas muestra reconocidas cuando se ensayan puras.

Ejemplo 5: Influencia de la detección simultánea de antígeno capsídico y de anticuerpos anti-VHC sobre el diagnóstico y la disminución de la ventana serológica.

Se han ensayado ocho paneles de seroconversiones comercializados (NNI, Boston Biomedica, US), (Impath, US) con el protocolo según la invención (designado ensayo combo) siguiendo los protocolos 1a (con el péptido C-G-G-Cap 1-75 (G34-G44-G47) que contiene la SEC ID nº 4), 1c (con el péptido C-G-G-Cap 1-75 (G31-G44-G47) que contiene la SEC ID nº 5), y 1d (con el péptido C-G-G-Cap 1-75 (G34-G44-G47) que contiene la SEC ID nº 4).

En la tabla 8, se anotan los resultados obtenidos en detección de antígeno (ensayo ELISA), o de ARN (PCR) y en detección de anticuerpos y en combo (formatos 1a, 1c y 1d) sobre estas diferentes seroconversiones. Para 4 seroconversiones de 8, los protocolos 1a, 1c y 1d permiten detectar la primera extracción positiva de manera concomitante a la aparición del ARN viral detectado por PCR. El número de días medio, entre la detección de antígeno y la detección de anticuerpos que corresponde a la reducción de la ventana serológica, es de 33 días para los dos protocolos 1a, 1c y 1d.

Tabla 8:

Panel IMPATH/BBI	Retraso (días) con respecto al 1º día de detección ARN VHC					Reducción de la ventana serológica con el ensayo Combo días
	Ag VHC	Ac VHC	Combo VHC 1a	Combo VHC 1c	Combo VHC 1d	
6211 (NS3)	0	46	10	10	NT	36
6225 (NS3)	0	33	2	2	2	31
6227 (CAP-NS3-NS4)	0	32	4	4	4	28
6229 (NS3)	0	24	0	0	0	24
9041 (NS3)	0	38	3	3	3	35
907 (CAP)	0	13	0	0	0	13
6222 (CAP-NS3)	0	23	0	0	0	23
917 (CAP-NS3)	0	72	0	0	0	72
						Media = 33 días

NT = no ensayado

5 **Ejemplo 6: Comparación de rendimientos y clasificación de diversas técnicas sobre sueros de seroconversión**

10 Se han ensayado 21 paneles de seroconversión comercializados (BBI, Boston Biomedica Company, USA; Impath, USA), que presentan especificidades diferentes, con el ensayo según la invención según los protocolos 1a y 1c, y con una serie de ensayos comercializados, que están en realidad entre los mejores según la clasificación realizada por la MDA (Medical Devices Agency) en los Estados Unidos en febrero de 2002. Esta comparación tiene en cuenta el número de días de retraso de detección con respecto a la detección de ARN (ensayo PCR). Así, el kit que presenta la menor media general es la que más rendimiento tiene en precocidad de detección (tabla 9).

15 Tabla 9:

Panel Impath/BBI	Resultados expresados en días de retraso de detección con respecto a PCR							Antígeno diana
	Protocolo 1a invención	Protocolo 1c invención	PRotocolo 1d invención	Vitras Eci anti-HCV	Axsym HCV versión 3	"Ortho HCV 3.0 short incubation"	Access HCV Ab Plus	
907	0	0	0	13	18	18	13	CAP
909	0	0	0	28	33	28	28	CAP
912	4	4	4	7	7	7	7	CAP
913	0	0	0	2	12	7	7	CAP
914	0	0	0	16	16	16	16	CAP
6215	0	0	0	20	20	20	20	CAP
Sub-total	4	4	4	86	106	96	91	
904	9	9	9	9	9	9	18	NS3
915	12	12	12	12	5	14	17	NS3
6212	23	23	23	12	12	12	23	NS3
6224	19	19	19	19	19	19	19	NS3
9041	3	3	3	62	62	62	62	NS3
9044	0	0	0	25	21	25	25	NS3
9047	0	0	0	28	28	28	28	NS3
Sub-total	66	66	66	167	156	169	192	
905	11	11	11	14	14	14	21	NS3/CAP
908	19	19	19	13	11	19	19	NS3/NS4
910	5	5	0	8	8	8	8	CAP/NS4
911	0	0	0	14	14	14	14	CAP/NS3-NS4
917	0	0	0	72	72	72	72	NS3/CAP
6213	32	26	26	26	26	32	32	CAP/NS3-NS4
6214	30	30	30	30	25	30	30	NS3/NS4
6222	0	0	0	21	21	21	21	CAP/NS3
Sub-total	97	91	86	198	191	210	217	
Media general	7,9	7,7	7,4	21,5	21,6	22,6	23,8	



Última extracción no detectada: + 3D añadidos de manera arbitraria

5 Los resultados generados con los protocolos 1a, 1c y 1d según la invención permiten una detección más precoz de la infección VHC (sólo 8 días de retraso de media con respecto a PCR para el protocolo 1a, 7,7 días para el protocolo 1c, 7,4 días de retraso para el protocolo 1d), antes de la aparición de los anticuerpos.

10 Así, el ensayo descrito según la invención obtiene el primer lugar en esta clasificación, y eso antes de los tres protocolos (1a, 1c y 1d) que suponen parejas de anticuerpos y péptidos mutados diferentes.

10 En conclusión, los resultados obtenidos con los protocolos 1a, 1c y 1d según la invención muestran que esta última permite efectivamente detectar la infección por VHC muy precozmente, con una sensibilidad bastante próxima de la de PCR, permitiendo al mismo tiempo seguir la evolución serológica del paciente después de la seroconversión.

15 **Ejemplo 7: Estudio de especificidad sobre los 3 protocolos combo 1a, 1c y 1d**

20 El estudio de especificidad se realizó sobre unos sueros de donantes de sangre (que provienen del Etablissement Français du Sang, Rungis, Francia). Los resultados obtenidos para los diferentes protocolos 1a, 1c y 1d se han anotado respectivamente en las tablas 10, 11 y 12.

Tabla 10: protocolo 1a

Número de sueros encontrados negativos	968
Sueros reactivos confirmados	1
Sueros reactivos confirmados (%)	99,9
Media de los negativos en Ratio (DO muestra/valor límite)	0,23
Desviación típica	0,077
Número de desviaciones estándar para el valor límite	10

25 Tabla 11: Protocolo 1c

Número de sueros encontrados negativos	2475
Sueros reactivos confirmados	6
Sueros reactivos confirmados (%)	99,8
Media de los negativos en Ratio (DO muestra/valor límite)	0,14
Desviación típica	0,063
Número de desviaciones estándar para el valor límite	13,9

Tabla 12: Protocolo 1d

Número de sueros encontrados negativos	2475
Sueros reactivos confirmados	4
Sueros reactivos confirmados (%)	99,8
Media de los negativos en Ratio (DO muestra/valor límite)	0,18
Desviación típica	0,055
Número de desviaciones estándar para el valor límite	14,8

30 Se observan buenos rendimientos en especificidad, sea cual sea el protocolo (1a, 1c o 1d) utilizado.

35 Como se habrá podido constatar a lo largo de esta descripción, el ensayo Combo VHC según la invención es capaz, de manera sorprendente, gracias a la captura del antígeno de la cápside y a la de los anticuerpos anti-cápside sobre una sola y misma zona proteica de la cápside, proporcionar una sensibilidad que se acerca a la de la PCR y mejor que la de algunas técnicas de la técnica anterior.

Este resultado es sorprendente, ya que modificando los péptidos cápside diana, los inventores corrían el riesgo de perder la detección de un cierto número significativo de anticuerpos.

Ejemplo 8: detección de una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (BIH-1)

El procedimiento descrito en la presente invención se aplica también a la detección de la infección que se debe a cualquier tipo de microorganismos infecciosos (como virus, tales como, por ejemplo, los virus responsables de las diversas hepatitis, los retrovirus, en particular los retrovirus responsables del SIDA en el ser humano (VIH-1, VIH-1 grupo O, VIH-2) o el simio, el citomegalovirus (CMV), los flavivirus, de los cuales los virus del dengue, así como las bacterias, los parásitos microbianos, etc.) para los cuales es deseable una detección simultánea de antígenos y de anticuerpos.

El ejemplo 8 muestra la aplicación de la presente invención a la detección simultánea del antígeno viral P25 (gag) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1, es decir "HIV-1" en inglés) y de anticuerpos anti-P25.

Materiales comunes para los protocolos a, b, c:

- 1) Fase sólida seleccionada: microplacas Maxisorp, Nunc (Dinamarca).
- 2) Diluyente de la 1ª etapa: Tris, NaCl 0,05 M, a pH 6,7 adicionado de NP40 (IGEPAL CA 630, Sigma) al 0,25%.
- 3) Diluyente de la 2ª etapa: tampón Tris NaCl 0,01 M, pH 7,4 adicionado de Tween 20 al 0,1%,
- 4) Solución de revelación: la solución de revelación está compuesta
 - 4a) de un tampón sustrato: solución de ácido cítrico (0,075 M), y de acetato de sodio (0,1 M), a pH 4,0, que contiene H₂O₂ al 0,015% y dimetilsulfóxido (DMSO)(PROLABO) al 4%, y
 - 4b) de un reactivo cromógeno: tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) a 0,7 mM en concentración final en el tampón sustrato.
- 5) Solución de parada: H₂SO₄ 1N.

Materiales del protocolo a: detección de anticuerpos anti-P25 VIH1

Péptido sintético mutado que corresponde a la secuencia siguiente SEC ID nº 22

²⁹³FRGYVGRFYKTLRAEQAGQGKVFMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTAC₃₅₀

y que comprende las mutaciones (G295-G298-G310-G312-F316) con respecto a la secuencia consenso de la proteína P25 del VIH-1 M es decir SEC ID nº 23

²⁹³FRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTAC₃₅₀

Conjugado anticuerpo policlonal de carnero anti-IgG (H+L) humanos marcado con peroxidasa (Bio-Rad). Este conjugado se diluye, antes del uso, en el diluyente de la 2ª etapa (descrita anteriormente) a fin de permitir obtener *in fine*, con una muestra positiva bien documentada, una densidad óptica elevada, y esto en condiciones bien conocidas por el experto en la materia.

Materiales para el protocolo b: detección de antígeno P25 VIH-1

Anticuerpo monoclonal anti-P25 Pm25 que reconoce la secuencia de la proteína P25 VIH-1 M siguiente

³⁰⁸QASQEVKNWMTETLL₃₂₂ (SEC ID nº 24)

Conjugado anticuerpo monoclonal Pm25 descrito anteriormente marcado con peroxidasa. Este conjugado se diluye, antes del uso, en el diluyente de la 2ª etapa (descrita anteriormente) a fin de permitir obtener *in fine*, con una muestra positiva bien documentada, una densidad óptica elevada, y esto en condiciones bien conocidas por el experto en la materia.

Materiales para el protocolo c: detección simultánea («Combo») de anticuerpo anti-P25 y de antígeno P25 VIH-1

Péptido sintético mutado que corresponde a la secuencia siguiente SEC ID nº 22

²⁹³FRGYVGRFYKTLRAEQAGQGKVFMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTAC₃₅₀

Anticuerpo monoclonal Pm25 que reconoce la secuencia de la proteína P25 VIH-1 M siguiente

³⁰⁸QASQEVKNWMTETLL₃₂₂ (SEC ID nº 24)

ES 2 433 920 T3

Conjugado anticuerpo policlonal de carnero anti-IgG (H+L) humanas marcado con peroxidasa (Bio-Rad).

Conjugado anticuerpo monoclonal Pm25 descrito anteriormente marcado con peroxidasa.

Los 2 conjugados inmuno-peroxidásicos anteriores son diluidos juntos, antes del uso, en el diluyente de la 2ª etapa (descrita anteriormente) a fin de permitir obtener *in fine*, con una muestra positiva bien documentada, una densidad óptica elevada, y esto en condiciones bien conocidas por el experto en la materia.

Métodos:

Protocolo a: detección de los anticuerpos anti-P25 VIH-1

El principio del ensayo se basa en un método inmunoenzimático de tipo indirecto para la detección de los anticuerpos anti-P25 VIH-1.

Se basa en las etapas siguientes: una solución de sensibilización se realiza en primer lugar con el péptido mutado SEC ID nº 22 (G295-G298-G310-G312-F316) que comprende la secuencia SEC ID nº 22 en tampón carbonato pH 9,6

Las cúpulas de una placa de microtitración (Nunc, Maxisorp) son entonces sensibilizadas con la solución anterior a razón de 110 µl por cúpula.

Las placas de microtitración se ponen a incubar durante una noche a temperatura ambiente (18-24°C).

Después de la eliminación de la solución de sensibilización, las placas se lavan con la ayuda de un tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) que contiene el 0,1% de Tween 20, y después saturadas por adición de un tampón fosfato (0,01 M, pH 7) que contiene el 5% de sacarosa, el 25% de leche desnatada (Candia™, Francia, o cualquier otra leche desnatada equivalente del comercio).

En cada cúpula, se distribuyen sucesivamente 80 µl de diluyente de 1ª etapa, y después 20 µl de muestra (suero o plasma).

El medio de reacción se pone a incubar a 37°C durante 1 hora. Si unos anticuerpos anti-P25 VIH-1 están presentes, estos se unen al péptido fijado sobre la fase sólida.

Se lavan después las placas (3 veces) con la ayuda de una solución de lavado (tampón Tris NaCl 0,01 M, pH 7,4, adicionado de Tween 20 al 0,1%).

En cada cúpula, se distribuyen 100 µl de diluyente de la 2ª etapa, que contiene los anticuerpos anti-IgG (H+L) humanos marcados con peroxidasa. El medio de reacción se pone a incubar a temperatura ambiente (18-24°C) durante 30 minutos. Los anticuerpos anti-IgG (H+L) humanos marcados se fijan a su vez a los anticuerpos específicos retenidos sobre la fase sólida.

Las placas se lavan después (5 veces) con la ayuda de una solución de lavado (tampón Tris NaCl 0,01 M, pH 7,4, adicionado de Tween 20 al 0,1%). El conjugado anti-IgG humano no unido es así eliminado.

En cada cúpula, se distribuyen 100 µl de la solución de revelación. La reacción se deja desarrollar en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-24°C).

Después, se distribuyen 100 µl de solución de parada en cada cúpula.

Después de la parada de la reacción, la lectura de la densidad óptica se efectúa con el espectrofotómetro de 450/620 nm.

Protocolo b: detección del antígeno P25 VIH-1

El principio del ensayo se basa en un método inmunoenzimático de tipo sándwich para la detección de antígeno P25 VIH-1. Se basa en las etapas siguientes:

Una solución de sensibilización se realiza en primer lugar con el anticuerpo monoclonal anti-P25 VIH-1 (Pm25) en tampón carbonato pH 9,6.

Las cúpulas de una placa de microtitración (Nunc, Maxisorp) son entonces sensibilizadas con la solución anterior a razón de 110 µl por cúpula.

ES 2 433 920 T3

Las etapas siguientes son idénticas a las del protocolo hasta la segunda etapa.

5 Para la segunda etapa, se distribuyen 100 µl de diluyente de la 2ª etapa, que contiene los anticuerpos Pm25 marcados con peroxidasa. El medio de reacción se pone a incubar a temperatura ambiente (18-24°C) durante 30 minutos. El anticuerpo monoclonal Pm25 marcado se fija entonces al anticuerpo P25 retenido sobre la fase sólida, cuando está presente.

10 Las etapas finales son idénticas a las del protocolo a.

Protocolo c: detección simultánea ("combo") del antígeno P25 VIH-1 y de anticuerpos anti-P25 VIH-1 en una muestra (suero o plasma)

15 El principio del ensayo se basa en un método inmunoenzimático de tipo sándwich para la detección de antígeno y de tipo indirecto para la detección de anticuerpos.

Se basa en las etapas siguientes:

Se realiza en primer lugar una solución de sensibilización:

20 * con el péptido mutado SEC ID nº 22 (G295-G298-G310-G312-F316), y

* con el anticuerpo monoclonal anti-P25 (Pm25) en tampón carbonato pH 9,6.

25 Las cúpulas de una placa de microtitración (Nunc, Maxisorp) son entonces sensibilizadas con la solución anterior a razón de 110 µl por cúpula.

Las placas de microtitración se ponen a incubar durante una noche a temperatura ambiente (18-24°C).

30 Después de la eliminación de la solución de sensibilización, las placas se lavan con la ayuda de un tampón fosfato (0,01 M, pH 7,4) que contiene el 0,1% de Tween 20, y después se saturan mediante la adición de un tampón fosfato (0,01 M, pH 7) que contiene el 5% de sacarosa, el 25% de leche desnatada (Candia™, Francia, o cualquier otra leche desnatada equivalente del comercio).

35 En cada cúpula, se distribuye sucesivamente 80 µl de diluyente de 1ª etapa, y después 20 µl de muestra (suero o plasma).

40 El medio de reacción se pone a incubar a 37°C durante 1 hora. El antígeno P25 eventualmente presente se une al anticuerpo monoclonal de la fase sólida. Asimismo, si unos anticuerpos anti-P25 están presentes, estos se unen al péptido antigénico fijado sobre la fase sólida.

Las etapas siguientes son idénticas a las del protocolo 1a hasta la segunda etapa.

45 Para la segunda etapa, se distribuyen 100 µl de diluyente de la 2ª etapa, que contiene el anticuerpo monoclonal Pm25 marcado con peroxidasa y los anticuerpos anti-IgG (H+L) humanas marcados con peroxidasa. El medio de reacción se pone a incubar a temperatura ambiente (18-24°C) durante 30 minutos. El anticuerpo monoclonal Pm25 marcado se fija entonces al antígeno P25 retenido sobre la fase sólida. Asimismo, los anticuerpos anti-IgG (H+L) humanos marcados se fijan a su vez a los anticuerpos específicos retenidos sobre la fase sólida.

50 Las etapas finales son idénticas a las del protocolo a.

Resultados:

Muestra	Protocolo a (D.O.)	Protocolo b (D.O.)	Protocolo c (D.O.)
Positivo en Anticuerpo anti-P25			
Ech. 1	0,138	-	0,316
Ech. 2	0,513	-	0,946
Positivo en antígeno P25			
Nº1	-	1,104	1,151
nº2	-	0,587	0,695
Negativo en Anticuerpo anti-P25 Y en antígeno P25			
Ech. 3	0,045	0,051	0,125
Ech. 4	0,025	0,049	0,179

Como se puede constatar también aquí, asimismo, la captura del antígeno P25 del VIH-1 y la de los anticuerpos anti-P25 del VIH-1 se hace, en la presente invención, sobre una sola y misma zona proteica de la cápside: la zona antigénica que captura los anticuerpos anti-P25 (AA 293-350) incluye la zona de especificidad antigénica (AA 308-322) por la cual el anticuerpo anti-P25 inmovilizado (Pm25) captura el antígeno P25.

Por supuesto, el experto en la materia, inspirándose del presente ejemplo 8, por ejemplo, podrá también realizar fácilmente un inmunoensayo de detección simultánea del antígeno P25 (gag) del VIH-1, de los anticuerpos anti-P25 del VIH-1 y de los anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína gp41 (envoltura) del VIH-1. Para la detección de los anticuerpos anti-gp41 del VIH-1, podrá utilizar, a título de ejemplo no exhaustivo, bien la gp41 entera, natural o recombinada, en sí conocida, o bien un péptido que contiene el epítipo inmunodominante de la gp41, tal como el descrito por la publicación Gnann, JW, *et al.* (1987).

Asimismo, forman parte de la invención unos inmunoensayos de detección simultánea del antígeno P26 (gag) del VIH-2 (es decir "HIV-2" en inglés), unos anticuerpos anti-P26 del VIH-2 y unos anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína gp36 (envoltura) del VIH-2. El experto en la materia podrá recurrir, para detectar el antígeno P26, a anticuerpos anti-P26, en sí conocidos y, para detectar los anticuerpos anti-P26, a unos péptidos antigénicos de la p26, por ejemplo, derivables de la secuencia del VIH-2 publicada por Guyader *et al.* (1987). Para la detección de los anticuerpos anti-gp36, el experto en la materia podrá haber recurrido, a título de ejemplo no exhaustivo, bien a la gp36 entera, natural o recombinada, en sí conocida, o bien a un péptido que contiene el epítipo inmunodominante de la gp36, tal como el descrito por la publicación Gnann, JW., *et al.* (1987).

Será asimismo posible realizar fácilmente un inmunoensayo "combo VIH-1 + VIH-2" combinando simultáneamente la detección del antígeno P25 del VIH-1, del antígeno P26 del VIH-2, unos anticuerpos anti-P25 del VIH-1, unos anticuerpos anti-P26 del VIH-2, unos anticuerpos anti gp41 del VIH-1 y unos anticuerpos anti-gp36 del VIH-2, que también forman parte de la invención.

Referencias bibliográficas

- Alcon *et al.*, J. of Clin. Microbiol., 2002, vol. 40(2), p. 376-381
- Atherton *et al.* (1989) "solid phase peptide synthesis, a practical approach", IRL Press, Oxford University Press, p. 25-34
- Benoit y al, (1982) PNAS USA, 79, p. 917-921
- Berck y Schultz, (1986), Arch. Pathol. Lab. Med., 10, p. 13-20
- Bukh, Semin. Liver Dis. (1995) 15: 41-63;
- Cerino *et al.*, (1991), J. Immunology, Vol. 147(8), p. 2692-2696.
- Clayes *et al.* (1995), J of Médical Virology, 45, p. 273-281
- Garson *et al.*, (1990) Lancet, 336, p. 878-879;
- Gnann, JW., *et al.* (1987) Science, 237: p. 1346-1349
- Guyader *et al.* (1987) Nature 326, p. 662-669
- Hajime Tokita *et al.* (2000) J. Clin. Microbiol. Vol. 38, p. 3450-3452
- Harlow *et al.* (1988) ed., "Antibodies: a laboratory manual"
- Hermanson Greg T., (1996) Bioconjugate techniques, Academic Press, New York, p. 373-380 y p. 580-583.
- Hosein *et al.* (1991) PNAS Vol. 88, mayo, p. 3647 - 3651
- Icardi *et al.* (2001) J. Clin. Microbiol., 39, p. 3110-3114
- Ishida, (1993), J. Clin. Microbiol., Vol. 31, No. 4., p. 936-940.
- Kôhler y Milstein, (1975) Nature, 256, p. 495-497
- Leahy *et al.* (1991) Third International Symposium on HCV, Strasbourg, poster B35
- Maiolini *et al.*, (1978) Journal of Immunological Methods, 20, p. 25-34
- Marks *et al.* (1991) J. Mol. Biol, 222, p. 581-597
- Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc, 85, p. 2149-2154;
- Nasoff *et al.* (1991) PNAS Vol. 88, nº. 12, p. 5462 - 5466,
- Okamoto *et al.* (1990a) Japan J. Exp. Med., vol. 60(3), p. 167-177
- Okamoto *et al.* (1990b) Japan J. Exp. Med., vol. 60(4), p. 223-233
- Peterson *et al.* (2000) Vox sanguinis, Vol. 78, p. 80-85,
- Ratner *et al.* (1985) Nature, 313, p. 277-284
- Sällberg *et al.* (1992) J. Clin. Microbiology, Vol. 30(8), p. 1989-1994
- Sanchez-Pescador *et al.* (1985) Science, 227, p. 484-492
- Scott *et al.* (1990), Science, 249, p. 386-390
- Sheppard, dans «Peptides 1971», Nesvadba H (ed.) North Holland, Amsterdam, p. 111
- Shieh *et al.* (1991) Laboratory Investigation Vol. 65, No. 4, p. 408 - 411
- Simmonds, (1995), Hepatology, 21, p. 570-583
- Stuyver *et al.* (1994), P.N.A.S. USA, 91, p. 10134-10138
- Takahashi *et al.* (1992) J. Gen. Virol., Vol. 73(3), London, p. 667-672
- Wain-Hobson *et al.* (1985) Cell, 40, p. 9-17
- Yang *et al.* (1995) Clin. Exp Immunol., 101, p. 272-277
- Yang *et al.* (1999), J of Médical Virology, 57, p. 345-350

Listado de secuencias

<110> BIORAD PASTEUR

5 <120> Procedimiento de detección simultánea de un antígeno y de un anticuerpo de microorganismo infeccioso

<130> BET 03P0457

<150> FR 0205808 '

10 <151> 10-05-2002

<160> 33

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1

<211> 75

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

20 <400> 1

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser
 65 70 75

25 <210> 2

<211> 63

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

30 <400> 2

Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp
 1 5 10 15

Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu
 20 25 30

Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser
 35 40 45

Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala
 50 55 60

35 <210> 3

<211> 53
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

5 <400> 3

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser
 50

10 <210> 4
 <21X> 75
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

15 <400> 4

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30

Gly Gly Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser
 65 70 75

20 <210> 5
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 5

ES 2 433 920 T3

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Gly Gly
 20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser
 65 70 75

<210> 6
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

5

<400> 6

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30

Gly Val Tyr Gly Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser
 65 70 75

10

<210> 7
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

15

<400> 7

Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp
 1 5 10 15

Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Gly Tyr Leu Leu
 20 25 30

Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala Thr Arg Lys Thr Ser
 35 40 45

Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala
 50 55 60

<210> 8
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

<4 00 > 8

Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp
 1 5 10 15

Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Gly Gly Gly Val Tyr Leu Leu
 20 25 30

Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala Thr Arg Lys Thr Ser
 35 40 45

Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala
 50 55 60

<210> 9
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 9

Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp
 1 5 10 15

Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Gly Leu
 20 25 30

Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala Thr Arg Lys Thr Ser
 35 40 45

Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg
 50 55 60

Arg Pro Glu Gly Arg Ser
 65 70

<210> 10
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 10

ES 2 433 920 T3

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30

Gly Gly Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser
 50

<210> 11

<211> 53

5 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 11

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Gly Gly
 20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser
 50

10

<210> 12

<211> 53

<212> PRT

15 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 12

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30

Gly Val Tyr Gly Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser
 50

20

<210> 13

<211> 73

ES 2 433 920 T3

<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 13

5

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
20 25 30

Gly Gly Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Arg Ala Thr Arg
35 40 45

Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro
50 55 60

Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser
65 70

<210> 14
<211> 75
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

10

<220>
<221> MOD_RES
<222> (45)..(45)
<223 > bAla

15

<400> 14

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
20 25 30

Gly Gly Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Ala Val Arg Ala
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
50 55 60

20

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser
65 70 75

<210> 15
<211> 76
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

25

<400> 15

ES 2 433 920 T3

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30

Gly Gly Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Gly Gly Arg
 35 40 45

Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln
 50 55 60

Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser
 65 70 75

<210> 16

<211> 75

5 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (29)..(29)

<223> Nle

<400> 16

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Leu Gly Val Gly
 20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50 55 60

15 Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser
 65 70 75

<210> 17

<211> 75

20 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 17

ES 2 433 920 T3

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
20 25 30

Gly Gly Phe Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser
65 70 75

<210> 18
<211> 75
5 <212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

<220>
10 <221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> homo-serina

<400> 18

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser
65 70 75

20 <210> 19
<211> 4
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

<4 00> 19

25 Leu Gly Val Arg
1

<210> 20
<211> 7
<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 20

Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu
1 5

5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 21

Gln Ile Val Gly Gly Val
1 5

15

<210> 22

<211> 58

<212> PRT

20 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 22

Phe Arg Gly Tyr Val Gly Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln
1 5 10 15

Ala Gly Gln Gly Val Lys Asn Phe Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln
20 25 30

Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala
35 40 45

Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys
50 55

25 <210> 23

<211> 58

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

30 <400> 23

Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln
1 5 10 15

Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln
20 25 30

Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala
35 40 45

Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys
50 55

ES 2 433 920 T3

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 5
 <400> 24

Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu
1 5 10 15

 10 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2

 15 <4 00> 25
Gln Thr Asp Pro Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln Thr Leu Leu
1 5 10 15

 <210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

 <400> 26

Leu Gly Leu Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
1 5 10
 25

 <210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

 <400> 27

Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
1 5 10
 35

 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213 > Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 40
 <400> 28

Leu Gly Leu Trp Gly Cys Ser Gly Lys His Ile Cys
1 5 10

 45 <210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213 > Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

 50 <400> 29

Leu Gly Met Trp Gly Cys Ser Gly Lys His Ile Cys
1 5 10

 55 <210> 30
 <211> 26

<212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 30

5

Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
 20 25

<210> 31
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

10

<400> 31

Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Ile Trp Gly Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn
 20 25 30

Ala Ser

15

<210 > 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2

20

<4 00> 32

Leu Asn Ser Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys
 1 5 10

25

<210> 33
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2

30

<400> 33

Arg Val Thr Ala Ile Glu Lys Tyr Leu Gln Asp Gln Ala Arg Leu Asn
 1 5 10 15

Ser Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys His Thr Thr Val Pro Trp
 20 25 30

Val Asn Asp Ser
 35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de detección *in vitro* de una infección por un microorganismo en una muestra biológica, que comprende la detección simultánea de al menos un antígeno de dicho microorganismo y de un anticuerpo dirigido contra dicho microorganismo, presentes en la muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:
- 10 a) disponer la muestra biológica con un anticuerpo de captura dirigido contra dicho microorganismo inmovilizado sobre una fase sólida, y un antígeno de captura derivado de dicho microorganismo inmovilizado sobre una fase sólida;
- 15 b) incubar la mezcla en condiciones que permiten la formación de complejos antígenos-anticuerpos;
- 20 c) revelar los complejos antígenos-anticuerpos formados, que utilizan un anticuerpo de detección, marcado, capaz de unirse al antígeno de dicho microorganismo capturado, y/o eventualmente también un antígeno de detección, marcado, capaz de unirse al anticuerpo dirigido contra dicho microorganismo capturado;
- 25 y en el que el antígeno de captura y/o el antígeno de detección, marcado, de dicho microorganismo comprende un fragmento antigénico de dicho microorganismo del cual al menos un epítipo está destruido, haciendo que sea incapaz de ser reconocido por el anticuerpo de captura y/o de detección dirigido contra el antígeno y al mismo tiempo capaz de unirse a los anticuerpos dirigidos contra el microorganismo, por reconocimiento de otros sitios epitópicos que permanecen intactos;
- 30 y el anticuerpo de captura y/o de detección, que son unos anticuerpos monoclonales o policlonales monoespecíficos, reconoce dicho al menos un epítipo, intacto, del antígeno capturado.
- 35 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se selecciona de entre el grupo constituido por virus, bacterias y parásitos microbianos.
- 40 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el microorganismo es un virus de la hepatitis C (VHC).
- 45 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el antígeno de captura comprende un fragmento antigénico de la proteína de la cápside del VHC, en el que al menos un sitio epitópico está destruido.
- 50 5. Procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, en el que el antígeno de captura comprende un fragmento antigénico de la proteína no estructural del VHC NS3 o NS4.
- 55 6. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el microorganismo es un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
- 60 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el VIH es un VIH-1 y/o un VIH-2.
- 65 8. Procedimiento según la reivindicación 6 ó 7, en el que el antígeno de captura comprende un fragmento antigénico de la proteína gag del VIH, en el que al menos un sitio epitópico está destruido.
9. Procedimiento según la reivindicación 6 ó 7, en el que el antígeno de captura comprende un fragmento antigénico de una proteína de envoltura del VIH.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en el que el antígeno de captura contiene al menos dos sitios epitópicos diferentes destruidos.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en el que el antígeno de captura contiene un sitio epitópico destruido por sustitución, delección o inserción, de al menos un aminoácido.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en el que el anticuerpo de detección se añade a la mezcla después de que los complejos antígenos-anticuerpos se hayan formado.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, en el que el anticuerpo de detección y/o el antígeno de detección, está dispuesto en la muestra biológica al mismo tiempo que el anticuerpo de captura y el antígeno de captura.
14. Procedimiento según la reivindicación 3, que comprende
- a) disponer la muestra biológica con un anticuerpo de captura del VHC y un antígeno de captura del VHC fijados sobre una fase sólida;
- b) incubar la mezcla en condiciones que permiten la formación de complejos antígenos-anticuerpos;

c) separar la fase sólida y de la fase líquida;

5 d) poner en contacto la fase sólida con, por un lado, un anticuerpo de detección, marcado, capaz de unirse al antígeno de VHC capturado y, por otro lado, un anticuerpo, anti-inmunoglobulina o anti-isotipo, o un antígeno de detección, marcado, capaz de unirse al anticuerpo anti-VHC capturado,

comprendiendo el antígeno de captura y el antígeno de detección, de anticuerpos anti-VHC unos fragmentos antigénicos de la proteína de la cápside del VHC, de los cuales se han destruido dos epítomos,

10 y los anticuerpos de captura y de detección que reconocen cada uno de dichos epítomos, intactos, del antígeno de la cápside capturado.

15 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección que reconocen cada uno un epítomo seleccionado de entre el grupo de epítomos de secuencias siguientes:

⁴⁴LGVR⁴⁷ (SEC ID nº 19), ³⁰IVGGVYL³⁶ (SEC ID nº 20) y ²⁹QIVGGV³⁴ (SEC ID nº 21).

20 16. Procedimiento de detección según la reivindicación 6 ó 7, que comprende:

a) presentar la muestra biológica con un anticuerpo de captura del VIH y un antígeno de captura del VIH fijados sobre una fase sólida;

25 b) incubar la mezcla en condiciones que permiten la formación de complejos antígenos-anticuerpos;

c) separar la fase sólida y de la fase líquida;

30 d) poner en contacto la fase sólida con un anticuerpo de detección, marcado, capaz de unirse al antígeno de VIH capturado y, uno o más anticuerpos, anti-inmunoglobulina o anti-isotipo, marcado, capaz de unirse al anticuerpo anti-VIH capturado,

comprendiendo el antígeno de captura de anticuerpo anti-VIH un fragmento antigénico de la proteína gag del VIH, del cual se ha destruido al menos un epítomo,

35 y los anticuerpos de captura y de detección que reconocen cada uno uno de dichos epítomos, intactos, del antígeno de la cápside capturado.

40 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección reconocen cada uno un epítomo de secuencia QASQEVKNWMTETLL (SEC ID nº 24).

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que la presentación de la muestra biológica con dicho anticuerpo de captura y dicho antígeno de captura fijados sobre una fase sólida se realiza en presencia de al menos un detergente de tipo no iónico.

45 19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicho detergente no iónico es el NP40.

20. Kit útil para la detección de una infección por un virus de la hepatitis C (VHC) o un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en una muestra biológica, que comprende:

50 - un antígeno de captura, inmovilizado sobre una fase sólida, que comprende un fragmento antigénico de una proteína de dicho VHC o VIH, comprendiendo dicho fragmento al menos un epítomo destruido, haciendo que sea incapaz de ser reconocido por un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección dirigidos contra dicho al menos un epítomo, intacto, seleccionado de entre el grupo de los epítomos de secuencias siguientes: ⁴⁴LGVR⁴⁷ (SEC ID nº 19), ³⁰IVGGVYL³⁶ (SEC ID nº 20), ²⁹QIVGGV³⁴ (SEC ID nº 21), QASQEVKNWMTETLL (SEC ID nº 24) y QTDPAVKNWMTQTLL (SEC ID nº 25), y conservar al mismo tiempo la capacidad de unirse a los anticuerpos dirigidos contra el microorganismo eventualmente presente en la muestra biológica, por reconocimiento de otros sitios epitópicos que permanecen intactos;

60 - dicho anticuerpo de detección, monoclonal o policlonal mono-especificado, dirigido contra dicho al menos un epítomo, intacto, de dicha proteína del VHC o VIH; y

- dicho anticuerpo de captura monoclonal o policlonal mono-específico, inmovilizado sobre una fase sólida, dirigido contra dicho al menos un epítomo, intacto, de dicha proteína del VHC o VIH;

65 siendo dicha proteína del VHC la proteína de cápside del VHC y el anticuerpo de captura y/o de detección que reconoce un epítomo seleccionado de entre el grupo de epítomos de secuencias siguientes: ⁴⁴LGVR⁴⁷

(SEC ID nº 19), ³⁰LVGGVYL³⁶ (SEC ID nº 20) y ²⁹QIVGGV³⁴ (SEC ID nº 21), o

siendo dicha proteína del VIH la proteína P25 del VIH-1 y el anticuerpo de captura y/o de detección que reconoce el epítipo de secuencia QASQEVKNWMTETLL (SEC ID nº 24), o

5 siendo dicha proteína del VIH la proteína P26 del VIH-2 y el anticuerpo de captura y/o de detección que reconoce el epítipo de secuencia QTDPVKNWMTQTLL (SEC ID nº 25).

10 21. Kit según la reivindicación 20, en el que dichos anticuerpos de captura y de detección están dirigidos contra un epítipo idéntico, intacto, de dicha proteína del VHC o VIH.

22. Kit según la reivindicación 20, en el que

15 - dicho antígeno de captura comprende un fragmento antigénico de dicha proteína de dicho VHC o VIH, haciendo que dicho fragmento, que comprende al menos dos epítipos destruidos, sea incapaz de ser reconocido por dicho anticuerpo de captura y dicho anticuerpo de detección, y

20 - dicho anticuerpo de captura es dirigido contra uno de dichos dos epítipos, intactos, de dicha proteína del VHC o VIH, mientras que el anticuerpo de detección es dirigido contra el otro de dichos dos epítipos, intactos, de dicha proteína del VHC o VIH.

23. Kit según una de las reivindicaciones 20 a 22, que comprende, además el antígeno de captura, un medio de detección de dichos anticuerpos anti-VHC presentes en la muestra biológica y que forman complejos con dicho antígeno de captura.

25 24. Kit según una de las reivindicaciones 20 a 22, que comprende, además del antígeno de captura, un medio de detección de dichos anticuerpos anti-VIH presentes en la muestra biológica y que forman complejos con dicho antígeno de captura.

30 25. Kit según la reivindicación 23 ó 24, en el que el medio de detección es un anticuerpo anti-inmunoglobulina o anti-isotipo marcado.

26. Kit según una de las reivindicaciones 20 a 23, que comprende:

35 a) un antígeno de captura que comprende un fragmento antigénico de una proteína del VHC, comprendiendo dicho fragmento por lo menos dos epítipos destruidos, y conservando al mismo tiempo la capacidad de unirse a los anticuerpos anti-VHC eventualmente presentes en una muestra biológica;

40 b) un anticuerpo de captura dirigido contra uno de dichos epítipos, intactos, de dicha proteína del VHC; siendo dicho antígeno de captura y dicho anticuerpo de captura inmovilizados en una fase sólida; y

c1) un anticuerpo de detección, marcado, dirigido contra otro de dichos epítipos, intactos, de dicha proteína del VHC, y/o

45 c2) eventualmente un antígeno de detección, marcado, que es un fragmento antigénico de una proteína del VHC, comprendiendo dicho fragmento al menos un epítipo destruido, y que conserva al mismo tiempo la capacidad de unirse con los anticuerpos anti-VHC eventualmente presentes en una muestra biológica.

27. Kit según la reivindicación 25, que comprende:

50 a) el antígeno de captura, que comprende un fragmento antigénico de una proteína del VIH, comprendiendo dicho fragmento al menos un epítipo destruido, y que conserva al mismo tiempo la capacidad de unirse a los anticuerpos anti-VIH eventualmente presentes en una muestra biológica;

55 b) un anticuerpo de captura dirigido contra uno de dichos epítipos, intactos, de dicha proteína del VIH; siendo dicho antígeno de captura y dicho anticuerpo de captura inmovilizados en una fase sólida;

60 c1) un anticuerpo de detección, marcado, dirigido contra otro de dichos epítipos, intactos, de dicha proteína del VIH,

65 c2) y/o eventualmente un antígeno de detección, marcado, que es un fragmento antigénico de una proteína del VIH, comprendiendo dicho fragmento al menos un epítipo destruido, y que conserva al mismo tiempo la capacidad de unirse con los anticuerpos anti-VIH eventualmente presentes en una muestra biológica.

28. Kit según una de las reivindicaciones 20 a 27, que comprende además, al menos un detergente de tipo no iónico.

29. Kit según la reivindicación 28, en el que dicho detergente de tipo no iónico es el NP40.

5 30. Péptido o polipéptido procedente de la proteína de la cápside del VHC, que lleva al menos un sitio epitópico intacto y que comprende cualquiera de las secuencias SEC ID nº 4 a SEC ID nº 18.

31. Péptido o polipéptido procedente de la proteína gag de un VIH que lleva al menos un sitio epitópico intacto y que comprende la secuencia SEC ID nº 22.

10

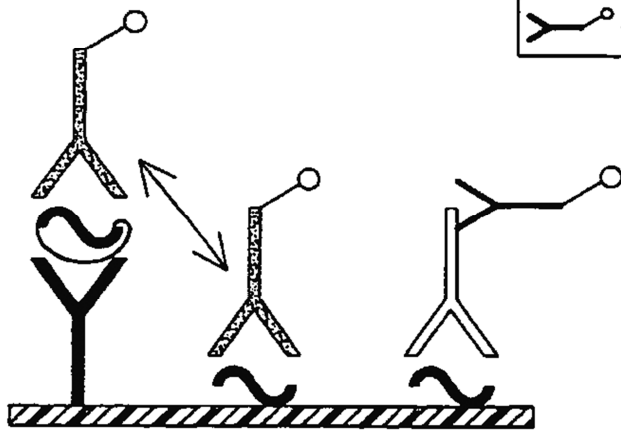
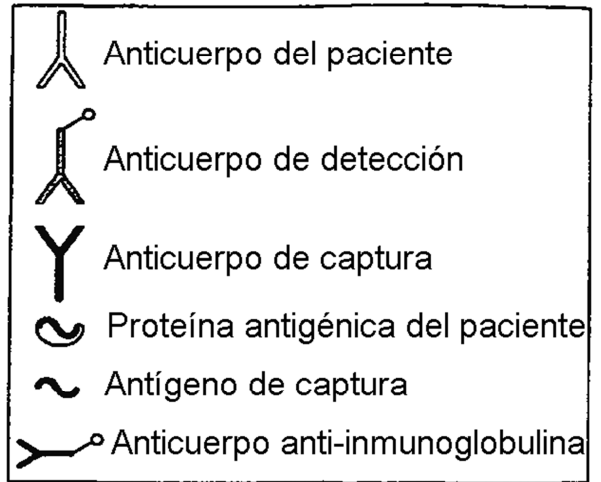


FIG.1

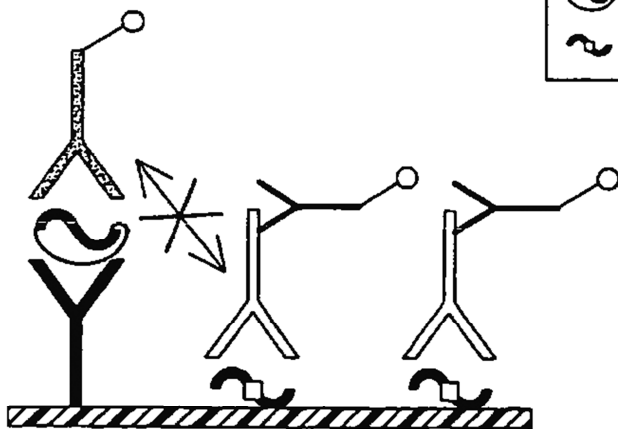
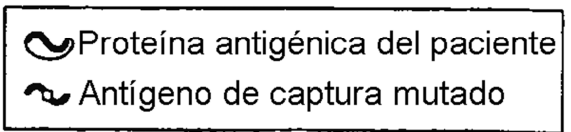


FIG.2