

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 497 016**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2010** **E 10716574 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014** **EP 2414839**

54 Título: **Soporte sólido de detección del VHC**

30 Prioridad:

30.03.2009 FR 0951949

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

22.09.2014

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'etoile, FR**

72 Inventor/es:

**BERLAND, JEAN-LUC y
PARANHOS-BACCALA, GLAUCIA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 497 016 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

Soporte sólido de detección del VHC

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico de la hepatitis C y en particular a un soporte sólido utilizable en un procedimiento de detección simultánea de un antígeno del virus de la hepatitis C (VHC) y de un anticuerpo dirigido contra una proteína del VHC.

La primera generación de ensayos para la detección de la infección por VHC se basaba en la detección de anticuerpos dirigidos contra unas proteínas no estructurales NS3/NS4 (EP 0 318 216; Choo *et al.* (1989)) utilizando en particular una proteína c100-3 de aproximadamente 360 aminoácidos fusionados con la proteína superóxido dismutasa. Esta primera generación permitía sin embargo detectar sólo del 70 al 80% de los sueros infectados por el virus.

La segunda generación de ensayos, todavía basada en la detección de anticuerpos, incorporaba unos antígenos de varias regiones, en particular de la proteína de Core, y unas proteínas NS3 y NS4 (Mimms *et al.* (1990); EP 0 450 931). Esta segunda generación representaba un progreso significativo ya que la sensibilidad superaba el 95% (Alter *et al.* (1992)).

La tercera generación de ensayos añadía a estos antígenos Core, NS3 y NS4 una proteína recombinante adicional de la región NS5 (Courouce *et al.* (1994)).

Sin embargo, esta detección se considera para los pacientes que presentan una sintomatología de la enfermedad crónica del hígado del VHC y detecta mal su fase precoz (los pacientes con sospecha de hepatitis C en fase aguda). Por ejemplo, este formato puede dejar pasar el material sanguíneo de algunos donantes de sangre contaminados en el marco de una transfusión sanguínea. La detección del virus en sí mismo es necesaria lo antes posible después de la contaminación y antes de la aparición de los anticuerpos. Esto se realiza mediante la detección de los ácidos nucleicos con la ayuda de una técnica de amplificación de tipo PCR (reacción de polimerasa en cadena) como se describe por Garson *et al.* (1990). Esta técnica, desafortunadamente, sigue siendo compleja de realizar, tanto desde el punto de vista de la preparación de la muestra, de los riesgos de contaminación, como de la automatización. Otro enfoque para la detección precoz de la infección por el VHC consiste en la detección del antígeno viral circulante de la proteína Core, como se describe por Takahashi *et al.* (1992), a pesar de que la cantidad de antígeno Core detectable sea baja y que el ensayo siga siendo complejo de realizar.

Para paliar estos inconvenientes, un ensayo de detección en combinación (denominado COMBO) de los antígenos del VHC y de los anticuerpos dirigidos contra el VHC representa un buen compromiso para beneficiarse al mismo tiempo de una detección precoz, mediante la detección del antígeno, y del seguimiento de la cronicidad del paciente, mediante la detección de los anticuerpos.

Sin embargo, esto plantea un problema mayor, el de la interferencia, que se refiere a la determinación del antígeno Core del VHC, entre los anticuerpos anti-VHC presentes en el suero y unos anticuerpos anti-VHC marcados utilizados para la detección del antígeno.

Esto es particularmente cierto en un sistema de detección simultánea, en la misma fase sólida, de anticuerpos antiproteína Core del VHC y de antígeno Core del VHC. Así, el depósito sobre la fase sólida, para la detección de anticuerpos antiproteína Core del VHC, de un antígeno Core que tiene los mismos epítomos que los reconocidos por los anticuerpos antiproteína Core VHC marcados, utilizados para la detección del antígeno Core, conlleva una fijación de anticuerpos marcados en la fase sólida y da como resultado una respuesta falsamente positiva del ensayo. Del mismo modo, en un proceso de fabricación de un soporte sólido en el que se necesita fijar al mismo tiempo un antígeno Core y un anticuerpo antiproteína Core, no es posible sensibilizar la fase sólida mediante una solución en mezcla de estos dos componentes bajo pena de ver el bloqueo de los sitios anticuerpos por los antígenos utilizados para la sensibilización del soporte sólido, impidiendo su reacción ulterior con los antígenos del suero del paciente. Estos fenómenos son por lo tanto muy handicapante para realizar un ensayo eficaz.

MORADPOUR DARIUS *ET AL.*: "Replication of hepatitis C virus" NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY, vol. 5, nº 6, junio de 2007, páginas 453-463 describe la replicación del VHC y las funciones de NS4B y NS5A.

El documento WO 01/38360 divulga la utilización de un polipéptido que comprende NS4B y NS5A con fines de diagnóstico. El polipéptido puede también comprender Core y E1 o E2. SILLANPÄÄ MAARIT *ET AL.*: "Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection" VIROLOGY JOURNAL 2009, vol. 6, página 84 (12 páginas) indica que las proteínas Core, NS3, NS4B y NS5A representan las proteínas antigénicas mayoritarias, mientras que las proteínas E1, E2 y NS4A son minoritarias.

El documento WO 00/07023 propone un ensayo COMBO con al mismo tiempo la detección de los antígenos Core y de los anticuerpos antiproteína Core en el que, para evitar el problema de la interferencia, los epítomos de la proteína Core, seleccionados para los diferentes componentes del kit, son diferentes. Los epítomos Core no están en número ilimitado, por lo tanto esta técnica presenta el inconveniente de utilizar unos epítomos menores y poco reconocidos.

Un enfoque parecido, pero sistematizado para combinar un máximo de epítomos no solapantes de la proteína Core y de anticuerpos monoclonales antiproteína Core, se describe en el documento WO 2008/027942, siempre para evitar este problema de interferencia.

5 El documento EP 1 251 353 utiliza la misma técnica, pero con una mezcla de antígenos más completa (NS3, NS4, NS5, Core) para la detección de los anticuerpos, pero aún con este problema de interferencia para la proteína Core.

10 El documento WO 03/095968 resuelve este problema modificando estructuralmente, en particular por sustitución de aminoácidos, ciertos epítomos diana de los antígenos utilizados para la captura de anticuerpos. Los epítomos así modificados son entonces destruidos. Simultáneamente, los anticuerpos utilizados para la captura y/o la detección de los antígenos son los seleccionados de tal manera que reconocen precisamente unos epítomos no modificados presentes en los antígenos del paciente, y que no puedan así unirse a los antígenos modificados, que no presenten ya estos mismos epítomos. Puesto que los epítomos ya no son idénticos, ya no existe por lo tanto competición entre los anticuerpos utilizados para capturar y/o detectar el antígeno de VHC y los anticuerpos del paciente. La captura del antígeno Core y la de los anticuerpos antiproteína Core podrán realizarse en una sola y misma zona proteica de la proteína Core y evitarán la pérdida de detección de un cierto número de anticuerpos antiproteína Core. Una estrategia parecida se describe en el documento WO 03/002749 en el que la proteína Core está modificada para que ciertos epítomos no sean reconocidos por los anticuerpos monoclonales utilizados en el ensayo.

15 El documento WO 01/096875 describe un ensayo COMBO en el que este problema de interferencia se resuelve combinando la detección del antígeno Core del VHC y unos anticuerpos dirigidos contra los epítomos discontinuos presentes en la proteína de 680 aminoácidos (aa) de NS3/NS4a. Pero los resultados en sensibilidad/especificidad son muy limitados en esta solicitud y no está demostrado que el nivel de sensibilidad sea suficiente para un ensayo de detección.

Existe por lo tanto una necesidad para un ensayo de detección del VHC combinado de antígeno y anticuerpo que sea sensible y específico, lo más sencillo posible y que evite el problema de la interferencia entre los antígenos y los anticuerpos dirigidos contra la proteína Core.

25 Para este fin, se ha encontrado un soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC, en el que se fija:

a) al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína Core de VHC,

b) y al menos un polipéptido que comprende al menos un epítomo de la proteína E2 del VHC, y al menos un epítomo de una proteína seleccionada entre las proteínas E1, NS3, NS4, NS5 del VHC,

30 y en el que dicho al menos un polipéptido no comprende un epítomo de la proteína Core del VHC.

En particular, sobre el soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección de VHC, se fija:

a) al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína Core de VHC,

b) y al menos un polipéptido que comprende al menos un epítomo de la proteína E2 del VHC,

35 c) y al menos un polipéptido que comprende al menos un epítomo de una proteína seleccionada entre las proteínas E1, NS3, NS4, NS5 del VHC,

y en el que dicho al menos un polipéptido no comprende un epítomo de la proteína de Core de VHC.

40 La invención propone además un procedimiento de detección *in vitro* de una infección por el VHC en una muestra biológica que comprende la detección de al menos un antígeno del VHC y de un anticuerpo dirigido contra el VHC presente en la muestra biológica y en el que se dispone de un soporte tal como el descrito anteriormente, se incuba dicho soporte con la muestra biológica en unas condiciones que permiten la formación de complejos antígenos-anticuerpo, se revelan los complejos antígenos-anticuerpos formados.

45 De manera ventajosa, el soporte sólido según la invención comprende o consiste en a) al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína Core del VHC, b) al menos un polipéptido que comprende o que consiste en al menos un epítomo de la proteína E2 del VHC y c) al menos un polipéptido que comprende o que consiste en al menos un epítomo de una proteína seleccionada entre las proteínas NS3, NS4, NS5 del VHC, preferentemente NS4B y NS5A.

50 De manera más ventajosa, el soporte sólido según la invención comprende o consiste en a) al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína Core del VHC, b) al menos un polipéptido que comprende o que consiste en al menos un epítomo de la proteína E2 del VHC y c) al menos un polipéptido que comprende o que consiste en al menos un epítomo de NS3 del VHC y al menos un epítomo de una proteína seleccionada entre las proteínas NS4, NS5 del VHC.

De manera preferida, el soporte sólido según la invención comprende o consiste en a) al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína Core del VHC, b) al menos un polipéptido que comprende o que consiste en al menos un

epítopo de la proteína E2 del VHC y c) al menos un polipéptido que comprende o que consiste en al menos un epítopo de NS3 del VHC y al menos un epítopo de una proteína seleccionada entre las proteínas NS4B y NS5A del VHC.

5 En otra forma de realización de la invención, el soporte sólido según la invención comprende o consiste en a) al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína Core del VHC, b) al menos un polipéptido que comprende o que consiste en al menos un epítopo de la proteína E2 del VHC y c) al menos un polipéptido que comprende o que consiste en al menos un epítopo de una proteína NS4B del VHC y al menos un epítopo de una proteína NS5A del VHC.

10 En todos los casos, ningún polipéptido que comprende un epítopo de la proteína Core del VHC está fijado en el soporte sólido.

El término VHC (virus de la hepatitis C) cubre todas las cepas, tipos, subtipos y genotipos del virus responsable de la hepatitis C. Esto incluyen los 6 genotipos principales 1, 2, 3, 4, 5, 6 así como sus subtipos 1a, 1b, etc.

Las regiones del VHC son definidas aproximadamente por la numeración empleada en Choo QL *et al.* 1991 y se resumen en la tabla siguiente para el VHC 1:

Dominio	Posición en aminoácidos aa
Core	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4A	1658-1711
NS4B	1712-1972
NS5A	1973-2420
NS5B	2421-3011

15 El término polipéptido (o antígeno) se refiere a un polímero de aminoácidos y no está limitado a un número mínimo de aminoácidos o a un tamaño particular. Los aminoácidos pueden ser naturales (los 20 que codifican una proteína), o sintéticos como la ornitina o el ácido γ -aminobutírico, o modificados por glicosilación, acetilación, fosforilación o equivalente, de tal manera que el polipéptido conserve la actividad deseada, en particular antigénica, frente a anticuerpos producidos por un paciente contra el VHC.

20 El término epítopo se refiere a una secuencia de al menos 3, 4 ó 5 aminoácidos, en particular entre 6-8 y 12-15 aminoácidos, que se une a un anticuerpo. No hay tamaño superior crítico para un epítopo. La secuencia de un epítopo puede comprender unas modificaciones denominadas conservadoras que no cambian significativamente la unión entre el epítopo y el anticuerpo desde un punto de vista de la especificidad.

25 Por la expresión "al menos un epítopo de la proteína X", se entiende la proteína X o uno o varios de sus epítopos. Así, por ejemplo, mediante la expresión "al menos un epítopo de la proteína E2" se entiende la proteína E2 en sí misma, o uno o varios de sus epítopos.

Asimismo, según un modo de realización preferido de la invención, sobre el soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC se fijan:

30 a) al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína de Core del VHC, y
 b) un polipéptido que consiste en (i) un péptido de la proteína E2 del VHC seleccionado entre la proteína E2 en sí misma, y uno o varios de sus epítopos, y (ii) un péptido de las proteínas E1, NS4B y/o NS5A del VHC seleccionado entre las proteínas en sí mismas y uno o varios de sus epítopos y, llegado el caso, también en (iii) un péptido de la proteína NS3 seleccionado entre la proteína en sí misma y uno o varios de sus epítopos.

35 Preferentemente, el péptido (ii) se selecciona entre las proteínas NS4B, NS5A y uno o varios de sus epítopos. Más preferentemente, el péptido (iii) no está presente en el polipéptido b).

Según otro modo de realización de la invención, sobre el soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC se fijan:

a) al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína de Core del VHC,

5 b) un péptido de la proteína E2 del VHC seleccionado entre la proteína E2 en sí misma o uno o varios de sus epítomos y

c) un péptido de las proteínas E1, NS4B y/o NS5A del VHC seleccionado entre las proteínas en sí mismas y uno o varios de sus epítomos, con, llegado el caso

d) un péptido de la proteína NS3 seleccionado entre la proteína en sí misma y uno o varios de sus epítomos.

10 Preferentemente, el péptido c) se selecciona entre las proteínas NS4B, NS5A y uno o varios de sus epítomos. Más preferentemente, el soporte no comprende péptido d).

Un polipéptido fijado sobre el soporte sólido puede comprender varios epítomos de proteínas diferentes, incluso de subtipos diferentes. Las construcciones de este tipo (Multiple Epitopes Fusion Antigens: MEFA) están bien descritas en los documentos WO 01/096875 o WO 97/44469.

15 Preferentemente, el polipéptido que comprende al menos un epítomo de la proteína E2 será diferente del polipéptido que comprende al menos un epítomo de E1 y/o NS4 y/o NS5.

20 Por proteína E2, se entiende una glicoproteína de revestimiento de un peso molecular de aproximadamente 70-72 kd. El término proteína E2 incluye también los mutantes y proteínas truncadas que tienen un comportamiento inmunológico similar con la proteína E2 (incluso reactividad cruzada entre los dos con un anticuerpo de referencia). Por ejemplo, una forma de E2 descrita en la técnica anterior se extiende desde la posición 384 a 746, pero otra forma de E2 se extiende hasta la posición 809 y en esta solicitud se describe una proteína E2 truncada más allá de la posición 683. Se han descrito unas inserciones entre los aminoácidos 383 y 384, así como unas deleciones entre las posiciones 384-387 (Kato *et al.* 1992). Preferentemente, la proteína E2 está truncada de al menos 10, 30, 50, 60, 63, 70, 80, 90, 126 aminoácidos de su parte C terminal.

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

30 Por "al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína Core", se entiende uno o varios anticuerpos antiproteína Core.

Los anticuerpos según la invención son bien unos anticuerpos policlonales bien monoclonales.

35 Los anticuerpos policlonales antes mencionados se pueden obtener por inmunización de un animal con al menos un antígeno de interés, seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpos de los otros constituyentes del suero, en particular por cromatografía de afinidad sobre una columna en la que está fijado un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, en particular un antígeno de interés.

40 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante la técnica de los hibridomas cuyo principio general se recuerda a continuación: en una primera etapa, se inmuniza un animal, generalmente un ratón (o unas células en cultivo en el ámbito de inmunizaciones *in vitro*) con un antígeno de interés, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra dicho antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos son después fusionados con unas células mielomatosas "inmortales" para dar lugar a los hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenidas, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y de multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma está multiplicado en forma de clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento frente al antígeno de interés podrán ser ensayadas por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia de una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados son después purificados en particular según la técnica de cromatografía de afinidad.

50 En el contexto de la invención, una muestra biológica está preferentemente constituida por un fluido biológico tal como suero, plasma, sangre, sangre total pero también orina, tejido, líquido cefalorraquídeo u otro. La muestra biológica puede ser tratada en una etapa previa o puesta en presencia de la fase sólida en unas condiciones, por ejemplo condiciones ácidas, que favorecen la exposición de los antígenos a detectar. Se pueden utilizar unos detergentes de tipo iónicos o no iónicos, por ejemplo el tritón X100 o el SDS (sodium dodecyl sulfate) o unos derivados de poli(oxietileno) como el NP40.

Los polipéptidos de la invención son producidos mediante las técnicas conocidas en sí mismas por el experto en la materia, utilizando las técnicas estándares de biología molecular y de ingeniería genética, o de manera química, en el caso de péptido de tamaño más pequeño, por ejemplo por síntesis en fase sólida. Todas estas técnicas son bien conocidas por el experto en la materia. Las regiones epitópicas de un antígeno pueden ser determinadas por las técnicas denominadas de cartografía de epítomos, como se describe en *Methods in Molecular Biology, Epitopes Mapping Protocols*, vol. 66, GE. Morris ed., 1996, Humana Press.

Por marcado, se entiende la fijación de un marcador capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable. Una lista no limitativa de estos marcadores consiste en: las enzimas que producen una señal detectable por ejemplo por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como la pexosidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la α -galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes, colorantes, las moléculas radioactivas como el ^{32}P , el ^{35}S o el ^{125}I , y las moléculas fluorescentes tales como la rodamina y los ficocianinos. También pueden ser utilizados unos sistemas indirectos, como por ejemplo unos ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. Las parejas ligando/anti-ligando son bien conocidas por el experto en la materia, como es el caso, por ejemplo, de las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del polinucleótido. En este caso, es el ligando el que se fija en el polipéptido o el anticuerpo. El anti-ligando puede ser detectable directamente por los marcadores descritos en el párrafo anterior o ser él mismo detectable por un ligando/anti-ligando.

El término soporte, sólido tal como se utiliza aquí, incluye todos los materiales en los que se puede inmovilizar un antígeno y/o un anticuerpo para una utilización en unos ensayos de diagnóstico. Unos materiales naturales, de síntesis, modificados o no químicamente, pueden ser utilizados como soporte sólido, en particular unos polímeros tal como policloruro de vinilo, polietileno, poliestireno, poliacrilato, poliamida, o copolímero a base de monómeros vinilaromáticos, ésteres de ácidos carboxílicos insaturados, cloruro de vinilideno, dienos o compuestos que presentan unas funciones nitrilo (acrilonitrilo); unos polímeros de cloruro de vinilo y de propileno, polímero de cloruro de vinilo y acetato de vinilo; copolímeros a base de estirenos o derivados sustituidos del estireno; unas fibras sintéticas tales como el nylon; unos materiales inorgánicos tales como la sílice, el vidrio, la cerámica, el cuarzo; unos látex, unas partículas magnéticas; unos derivados metálicos. El soporte sólido según la invención puede estar, sin limitación, en forma de una placa de microtitulación, de una hoja, de un cono, de un tubo, de un pocillo, de bolas, partículas o análogos, soporte plano como una oblea de sílice o silicio.

La fijación del o de los antígenos y anticuerpos sobre el soporte sólido puede realizarse mediante cualquier medio directo o indirecto, en particular por adsorción pasiva. La fijación de los antígenos y anticuerpos puede realizarse mezclando o secuencialmente, o una combinación de los dos.

En un modo de realización particular, todos los antígenos y anticuerpos de la invención se fijarán sobre la misma zona, por ejemplo en un pocillo de una placa de microtitulación.

En otro modo de realización, los antígenos y los anticuerpos se fijarán en unas zonas discretas y por lo tanto diferentes del soporte sólido como, por ejemplo, sobre un cono de VIDAS (bioMérieux, Marcy l'Etoile), por ejemplo como se utiliza en el kit HIV DUO.

La presencia de los anticuerpos y antígenos en la muestra biológica se reveló mediante unos 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 afín, reconociendo un sitio epitópico, diferente del reconocido por el anticuerpo de captura, o idéntico debido a la presencia de unidad repetitiva a nivel del antígeno. 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 o unos antígenos marcados. Todas estas técnicas de detección son bien conocidas por el experto en la materia.

El soporte sólido según la invención comprende al menos 1 anticuerpo dirigido contra la proteína Core, preferentemente al menos 2 anticuerpos dirigidos contra la proteína Core. En un modo de realización preferido, al menos uno de estos anticuerpos reconoce un epítomo seleccionado entre las posiciones en los aminoácidos 2 a 120 de dicha proteína Core, particularmente 15 a 90, ventajosamente los epítomos 20-24 (SEC ID N° 10: QDVKF); 29-33 (SEC ID N° 11: QIVGG); 58-65 (SEC ID N° 12: PRGRRQPI); 29-37 (SEC ID N° 13: QIVGGVYL); 7-17 (SEC ID N° 14: RKTKRNTN); 34-39 (SEC ID N° 15: VYLLPR); 73-86 (SEC ID N° 16: GRTWAQPGYPWPLY) como se define en C. Jolivet-Reynaud *et al.* (1998). El hecho de no tener problema de competición con el soporte sólido según la invención, debido a la ausencia del antígeno Core sobre dicho soporte, permite multiplicar el número de anticuerpos anti-Core fijados sobre el soporte sólido para mejorar la sensibilidad o la especificidad. Se puede tener, por lo tanto, al menos 2 o al menos 3 anticuerpos fijados sobre el soporte sólido.

En una combinación particular según la invención, sobre el soporte sólido para la parte detección de anticuerpo, se fija al menos un polipéptido que comprende al menos 10, ventajosamente 12, preferentemente 15 aminoácidos contiguos de la secuencia SEC ID n° 2, y/o de la secuencia SEC ID n° 4 y/o de la secuencia SEC ID n° 5 y/o de la secuencia SEC ID n° 7 y/o SEC ID n° 9.

Según un modo de realización particular, el soporte de la invención cumple al menos una de las características siguientes:

- el péptido (ii) comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia SEC ID nº 5 y/o de la SEC ID nº 7, y
- el péptido (i) comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia SEC ID nº 2.

5 En otra combinación particular según la invención sobre el soporte sólido, se fijan al menos 3 polipéptidos diferentes que comprenden al menos 10, ventajosamente 12, preferentemente 15 aminoácidos contiguos de la secuencia SEC ID nº 2, para un primer polipéptido, de la secuencia SEC ID nº 4 para un segundo polipéptido y de la secuencia SEC ID nº 5 y/o SEC ID nº 7 para el tercero.

10 Según un modo de realización particular, el soporte de la invención cumple al menos una de las características siguientes:

- el péptido c) comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia SEC ID nº 5 y/o de la SEC ID nº 7, y
- el péptido b) comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia SEC ID nº 2.

15 Este inmunoensayo combinado se puede realizar según diversos formatos bien conocidos por el experto en la materia: en fase sólida o en fase homogénea; 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 a un método de sándwich (para la detección de antígeno), a título de ejemplos no limitativos.

20 Un formato de inmunoensayo de tipo sándwich entre dos anticuerpos (de captura y de detección) es particularmente ventajoso para la detección de los antígenos presentes en la muestra biológica, mientras que los anticuerpos pueden ser revelados utilizando un antígeno de captura y un conjugado marcado que se fija sobre el anticuerpo (según un formato comúnmente designado como formato directo).

Igualmente, es posible un formato de inmunoensayo de detección de los antígenos por competición. También son posibles y bien conocidas por el experto en la materia otras modalidades de inmunoensayo.

25 La detección simultánea de antígeno del VHC y de anticuerpos dirigidos contra el microorganismo VHC puede ser realizada 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. De manera alternativa, los medios de detección, tales como en particular el o los anticuerpos de detección, pueden ser añadidos a la mezcla en una segunda etapa, es decir después de que los primeros complejos antígeno-anticuerpos se hayan formado. Se habla entonces de ensayo en dos fases.

30 La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes dados a título ilustrativo y no limitativo, así como con la ayuda de las figuras 1 y 2 anexas en las que:

Figuras:

35 La figura 1 representa un ejemplo de ensayo ELISA que utiliza un soporte sólido según la invención, en el que se fija un anticuerpo anti-proteína Core así como 4 antígenos del VHC, respectivamente E2, NS3, NS4 y NS5. Una muestra biológica del paciente A se incuba en contacto con este soporte sólido. Esta muestra, que puede ser un suero, contiene potencialmente unos anticuerpos anti-VHC, en particular anti-E2 y/o NS3 y/o NS4 y/o NS5 y unos antígenos del virus, en particular unos antígenos de Core susceptibles de reaccionar con los reactivos biológicos presentes en el soporte sólido. La revelación de la fijación de estos anticuerpos y antígenos de la extracción se realiza con un anticuerpo monoclonal anti-Core unido a la fosfatasa alcalina (AP) y un anticuerpo monoclonal (en la figura un fragmento de tipo Fab') anti-IgG humana, marcado también con la fosfatasa alcalina.

40 La figura 2 representa la composición en secuencia del clon PT alpha-E2-24: el promotor EF1 alfa está seguido por el sitio de restricción EcoRI y la región que contiene la secuencia de la cadena pesada de la región variable de la inmunoglobulina G (VH leader, secuencia subrayada) interrumpida por una secuencia intrón (secuencia en cursiva).
 45 La clonación del gen que codifica la proteína E2 (H384 a Q673) que contiene los marcadores (Maximilian: MRGSHHH y His₆: HHHHHH) se ha realizado después de la ligación del fragmento PCR digerido por Bsu361 y XbaI.

Ejemplo 1: material utilizado

Las secuencias proteicas son indicadas según la nomenclatura del código con una letra para los aminoácidos, de N terminal hacia C terminal.

50 1.1 Anticuerpos monoclonales antiproteína Core

Los anticuerpos monoclonales se han obtenido después de la inmunización de los ratones hembras BALB/c JYco de 4 a 6 semanas de edad (IFFA Credo, Les Oncins, L'Arbresle, Francia). Los ratones se han inmunizado por vía intraperitoneal. El protocolo consistía en siete inyecciones de la proteína VHC Core purificada (10 microgramos/ml) realizadas con dos semanas de intervalo. Las inyecciones de proteínas son realizadas con el adyuvante de Freund completo para la primera e incompleto para las siguientes. Cuatro días después de la última inyección, las células del bazo se han seleccionado y fusionado según el protocolo propuesto por Köhler y Milstein (1975, 1976) con las células mieloides de ratón Sp2/0-Ag14. Después de 12 a 14 días, los sobrenadantes de cultivo celular se han evaluado mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), en el que el mismo antígeno utilizado para las inmunizaciones se han depositado en fase sólida. Los clones positivos que segregan unos anticuerpos antiproteína Core se han subclonado dos veces mediante el método de dilución límite. Las ascitis se han obtenido de los ratones después de la inyección intraperitoneal de 0,5 ml de Pristano y de 10^6 células de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales IgG antiproteína Core se han purificado en columna de proteína-A Sefarosa 4 FF según las instrucciones de Pharmacia. Los anticuerpos monoclonales purificados se han biotinilado con el reactivo Sulfo-NHS-LC-Biotin (Merck, Rockford, IL) según Gretch *et al.* (1987) para los ensayos de determinación antigénica.

Una vez disponibles los anticuerpos, ha sido posible proceder a la identificación de los epítomos reconocidos sobre la proteína Core del VHC. Los resultados de la identificación de los epítomos específicos por 9 anticuerpos monoclonales obtenidos antiproteína Core se han publicado por Jolivet-Reynaud *et al.* (1998). Varios anticuerpos se seleccionaron mediante este procedimiento, y en particular el 19D9D6, el 7G9B8 y el 7G12A8. El anticuerpo monoclonal 19D9D6 pertenece al Grupo I y reconoce los 45 primeros aminoácidos de la proteína VHC Core, más precisamente la región que comprende los aminoácidos 25 a 45. Según la estructura en cristal del sitio antigénico inmunodominante de la proteína VHC Core complejo con el anticuerpo monoclonal 19D9D6, aparece que el epítomo mínimo lineal reconocido es el QIVGGVYLL, situado entre los aminoácidos 29-37 (Ménez *et al.* (2003)).

1.2 Proteína E2

Para proceder a los ensayos ELISA, fue necesario producir y purificar la proteína de revestimiento E2.

El fragmento de ADN que codifica el ectodominio del envoltura 2 (aa 384-673 del genoma VHC según Choo *et al.* 1991) se ha amplificado a partir de la cepa VHC-JA (genotipo 1b, plásmido pCMV-C980) por PCR y clonado en el vector de expresión estable pT-alfa. El gen de envoltura está bajo el control del promotor humano EF1 y del Poliovirus humano IRES («Internal Ribosome Entry») en el que está contenido el gen DHFR (Dihidrofolato reductasa) de ratón (marcador de selección). Dos secuencias adicionales de firmas "tags" se han introducido durante la clonación: la primera denominada Maximilian tag (MRGSHHH secuencia en aminoácidos (aa) representada por el código de una letra) situada en 5' del gen N terminal de la proteína traducida y la segunda His₆-tag (HHHHHH) situada en 3'. La construcción VHC E2 se ha controlado mediante secuenciación y su expresión se ha verificado por inmunotransferencia (anticuerpos anti-Maximilian tag y anti-His₆-tag) después de la transfección. La transfección de las células CHO («Chinese Hamster Ovarian») DHFR- se ha efectuado por electroporación del plásmido pT-alfa E2. El medio sin nucleósido se ha utilizado para la selección de los clones positivos. La amplificación de los clones se ha realizado a fin de aumentar el número de copias del gen que codifica para la envoltura 2 integrado en el plásmido con la ayuda de una concentración creciente de metotrexato (MTX): 20 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 micromol, 2 micromoles, 4 micromoles y 8 micromoles. La línea celular que expresa la proteína E2 se ha subclonado y el clon, denominado PTAalpha-E2-24, se ha seleccionado. La composición de este clon está descrita en la figura 2. Otros sistemas de expresión eucariota de tipo COS son utilizables para expresar esta proteína E2.

Una vez amplificado el clon E2 amplificado, se ha desarrollado un protocolo de purificación con la ayuda de marcadores histidina. Los marcadores histidina permiten purificar la proteína VHC E2 con una resina metal-quelato, tal como por ejemplo Ni-NTA de la compañía Qiagen, directamente a partir del sobrenadante de cultivo. Las cantidades de VHC E2 recuperadas después de la elución indican que se alcanza la capacidad de fijación máxima teórica de la columna. Se señala que no se detecta ninguna señal en el tampón de lavado después del paso sobre la columna. Alternativamente, los geles de electroforesis han sido objeto de una coloración con el reactivo Blue-PAGE (Fermentas) a fin de evaluar el grado de pureza de la proteína purificada. En la muestra final purificada y concentrada, sólo la proteína VHC E2 es detectada después de la coloración. El grado de pureza está por lo tanto estimado en $\geq 95\%$. Finalmente, las muestras obtenidas se determinaron con el kit micro-BCA (Pierce). El método de producción y de purificación nos permiten obtener de manera reproducible 5 mg de proteína por litro de sobrenadante.

Durante la expresión del clon PTAalpha-E2-24 en sistema CHO, la secuencia de E2 expresada es la siguiente SEC ID nº 1:

MRGSHHHHTHVTGGRVASSTQSLVSWLSQGPSQKIQLVNTNGSWHINRTALNC
 NDSLQGTGFIAALFYAHRFNASGCPERMASCRPIDKFAQGWGPITHVVPNISDQR
 PYCWHYAPQPCGIVPASQVCGPVYCFTPSPVVVGTDRSGVPTYSWGENETDV
 LLLNNTRPPQGNWFGCTWMNSTGFTKTCGGPPCNIGGVGNNTLICPTDCFRKH
 PEATYTKCGSGPWLT**PRCLVDY**PYRLWHYPCTINFTIFKVRMYVGGVEHRLNA
 ACNWRGERCDLEDRDRSELSPLLLSTTEWQ**HHHHHH**

La parte en negrita representa los aminoácidos aportados en la secuencia por el plásmido.

La secuencia sin estos aminoácidos del plásmido se indica mediante la SEC ID nº 2.

1.3 Proteína NS3

- 5 El gen que codifica para la proteína NS3 de dominio helicasa (aminoácidos: 1192-1458 según Choo QL et al (1991)), genotipo 1b, se ha clonado en el vector de expresión pMR80 (Cheynet *et al.*, 1993) en fusión con 6 histidinas situadas en la posición 5' del gen NS3 de dominio helicasa, como se ha descrito antes (Arribillaga *et al.*, 2002). Brevemente, la cepa bacteriana de *Escherichia coli* JM109 se ha inoculado en 50 ml de medio LB (Bacto-Tryptone 10g/l; extracto de levadura 5g/l, NaCl 10g/l) adicionado de 100 microg/ml de ampicilina y cultivada toda la noche a 37°C. Al día siguiente, el cultivo de la cepa bacteriana recombinante se diluyó al 1/50 y se cultivó a 37°C hasta que la densidad óptica (DO₆₀₀) alcance 0,6. La inducción de la expresión de la proteína NS3 de dominio helicasa se realizó después de la adición de 1mM de Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosida (IPTG) (Gibco/BRL), durante 3 a 4 horas a 30°C con una agitación de 250 rpm (unidades de rotación). Después de este tiempo, el residuo bacteriano se recoge en el tampón de lisis y se somete a una sonicación, después se centrifuga a 25000 g durante 30 min. La fracción soluble se utilizó para la purificación sobre columna Ni-NTA Agarosa (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La proteína recombinante NS3 de dominio helicasa se purificó con 300 mM de imidazol y se dializó toda la noche en PBS. La proteína se analizó en gel de azul de Coomassie después de la electroforesis en gel SDS al 12% y en espectrómetro de masa por análisis en MALDI-TOF con el instrumento Voyager DE-PRO.

La secuencia en aminoácido de la proteína NS3 de genotipo 1b expresada es la SEQ ID nº3:

MRGSHHHHHHGSVDESMDEFAVDFIPVESMETTMRSPVFTDNSSPPAVPQTF
 QVAHLHAPTGSKGKSTKVPAAYAAQGYKVRVLNPSVAATLGFGAYMSKAHGIE
 PNIRTGVRTITTTGGPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDWTTILGIGT
 VLDQAETAGARLVVLATATPPGSITVPHPNIEEVALSNTGEIPFYGKAIPLEAIKG
 GRHLIFCHSKKKCDELAAKLTGLGLNAVAYRGLDVSVIPTSGDVVVVATDAL
 20 **MTGFTGDFDSVIDCNTCV.**

La parte en negrita representa los aminoácidos aportados en la secuencia por el plásmido. La secuencia de NS3 sin estos aminoácidos del plásmido está indicada por la SEC ID nº 4.

De la misma manera, una proteína NS3 de dominio helicasa, pero que corresponde al genotipo 1a es preparada según el mismo modo de realización.

- 25 La secuencia en aminoácido de la proteína NS3 de genotipo 1a expresada es la SEC ID nº 8:

MRGSHHHHHHGSVDESMDEFAVDFIPVENLETTMRSPVFSNNSPPAVPQSY
 QVAHLHAPTGSKGKSTKVPAAYAAQGYKVLNPSVAATLGFGAYMSKAHGID
 PNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDATSILGIGTV
 LDQAETAGARLTVLATATPPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEIPFYGKAIPLEAIKG
 GRHLIFCHSKKKCNELAAKLVALGVNAVAYRGLDVSVIPTSGDVVVVATDA
 LMTGFTGDFDSVIDCNTCV.

La parte en negrita representa los aminoácidos aportados en la secuencia por el plásmido. La secuencia de NS3 de genotipo 1a sin los aminoácidos aportados por el plásmido está indicada por la SEC ID nº 9.

1.4 Proteína NS4B

El péptido sintético preparado según los métodos habituales en fase sólida y procedente de NS4B de genotipo 1b comprende los 31 aminoácidos de las posiciones 1909 a 1939 con relación a la numeración de la cepa HVC-1 (Choo *et al.* (1991)). La secuencia es la SEC ID nº 5: GEGAVQWMNRLIAFASRGNHVSPTHYVPESD.

1.5. Proteína NS5A

- 5 El gen que codifica para la proteína NS5A (aminoácidos: 2212 a 2311 según Choo Q.L. *et al.* (1991)), genotipo 1b, se ha clonado en un plásmido pET21b y se ha expresado en *E. coli* BL21 en fusión con 6 histidinas situadas en la posición 3' del gen NS5. Brevemente, la cepa bacteriana de *Escherichia coli* JM109 se ha inoculado en 50 ml de medio LB (Bacto-Tryptone 10g/l; extracto de levadura 5g/l, NaCl 10g/l adicionado de 100 microgramos/ml de ampicilina y cultivada toda la noche a 37°C. Al día siguiente, el cultivo de la cepa bacteriana recombinante se diluyó al 1/50 y se cultivó a 37°C hasta que la densidad óptica (DO₆₀₀) alcance 0,6. La inducción de la expresión de la proteína NS5 se realizó después de la adición de 0,4 mM Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Gibco/BRL), durante 3 a 4 horas a 30°C con una agitación de 250 rpm. Después de este tiempo, el residuo bacteriano se recoge en el tampón de lisis y se somete a una sonicación, después se centrifugan 25000 g durante 30 min. La fracción soluble se utilizó para la purificación sobre columna Ni-NTA Agarosa (Qiagen) siguiendo las instrucciones propuestas por el fabricante. La proteína recombinante NS5 se purificó con 300mM de imidazol y se dializó toda la noche en PBS. La proteína se analizó por electroforesis sobre gel SDS al 12% teñido de azul de Coomassie y por espectrometría de masas MALDI-TOF (Voyager DE-PRO).

La secuencia en aminoácido de la proteína NS5A expresada es la SEC ID nº 6:

MASKATCTTHDSPDADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFDPLRA
EEDEREVSVAEILRKSKKFPPALPIWARPDYNPPLLESWKSPDYVPPAVMRGS
HHHHHH

- 20 La parte en negrita representa los aminoácidos aportados en la secuencia por el plásmido.

La secuencia de NS5A sin estos aminoácidos aportados por el plásmido está indicada por la SEC ID nº 7.

Ejemplo 2: formato de los ensayos

El ensayo puede realizarse en microplacas de 96 pocillos, bien con los antígenos separados en pocillos individuales, o bien mezclados en un solo pocillo.

- 25 2.1. Formato del ensayo con los antígenos separados

1. Sensibilización ("coating") de los pocillos

a. Anticuerpos anti proteína Core

- 30 Los pocillos se sensibilizan durante 2 horas a 37°C sobre microplacas MaxiSorb de 96 pocillos (Nunc), con 200 microlitros de una solución del anticuerpo monoclonal de ratones anti proteína Core 19D9D6 diluido en 4 microgramos/ml en el tampón TBS (Tris tamponado con una solución salina). Las placas son lavadas 3 veces con 300 microlitros de TBS-Tween 20 0,05% (tampón de lavado) y después pasivadas durante una noche a temperatura ambiente en un tampón TBS-Tween 20 0,05%, BSA 20g/l (Sigma), IgG ratón 0,1g/l (Scantibodies laboratory) (tampón de pasivación). Las placas son lavadas 3 veces con 300 microlitros en tampón de lavado.

b. proteína E2

- 35 Los pocillos se sensibilizan durante 2 horas a 37°C sobre microplacas MaxiSorb de 96 pocillos (Nunc), con 200 microlitros de una solución del antígeno diluido en 1 microgramo/ml en el tampón TBS. Las placas son lavadas 3 veces con 300 microlitros de TBS-Tween 20 0,05% (tampón de lavado) y después pasivadas durante una noche a temperatura ambiente en un tampón TBS-Tween 20 0,05%, BSA 20g/l (Sigma), IgG ratón 0,1g/l (Scantibodies laboratory). Las placas son lavadas 3 veces con 300 microlitros en tampón de lavado.

- 40 c. NS3, NS4B y NS5A

El protocolo para cada proteína es idéntico al descrito anteriormente para la proteína E2.

2. Incubación de la muestra

Los pocillos son incubados con 200 microlitros de muestra diluidos al 1/10 en tampón de pasivación durante 1 hora a 37°C y después lavados 5 veces con 300 microlitros de tampón de lavado.

- 45 3. incubación de los conjugados

a. Conjugado para la detección de la proteína Core.

ES 2 497 016 T3

Se incuban 200 microlitros de una solución del anticuerpo monoclonal de ratón antiproteína Core 19D9D6 conjugado con la fosfatasa alcalina diluida a 0,1 microgramo/ml en tampón de pasivación durante 1 hora a 37°C. Los pocillos se lavan 5 veces con 300 microlitros de tampón de lavado.

b. conjugado para la detección de los anticuerpos del suero

- 5 Los pocillos sensibilizados con los antígenos E2, NS3, NS4B o NS5A son incubados durante 1 hora a 37°C con 200 microlitros de una solución de Fab' anti-igG humanos conjugado con la fosfatasa alcalina diluido en 0,05 microgramo/ml en tampón de pasivación. Los pocillos se lavan 5 veces con 300 microlitros de tampón de lavado.

4. Revelación

- 10 La reacción se revela con 200 microlitros de un sustrato pNPP (Sigma) durante 30 min. a temperatura ambiente y detenida por adición de 50 microlitros de NaOH 1M. La señal se lee sobre un lector de microplacas a 405 nm. El valor límite se calcula a partir de la señal dada por la media de 3 muestras negativas + 3 veces la desviación estándar de esta señal. El resultado se puede expresar en relación señal/límite (s/co); un s/co superior a 1 se interpreta como positivo.

2.2 Resultados del ensayo con los antígenos separados:

- 15 La precocidad de la detección, utilizando el formato de ensayo con los antígenos separados, se evalúa con 10 paneles de seroconversión de pacientes VHC proporcionados por Zeptometrix Corp (panel HCV 9044, 6212, 6213, 6214, 6215 y 6227) y Seracare BBI diagnostics (paneles PHV908, PHV(910(M), PHV911 y PHV917(M)). Las muestras son unos plasmas procedentes de extracciones longitudinales de personas infectadas por el VHC. Los resultados se expresan en señal/límite; los valores superiores a 1 son considerados positivos.
- 20 Los paneles PHV911, 9044, 6212, 6213 y 6215 se ensayan con la proteína NS3 de genotipo 1a y los paneles PHV908, PHV910(M), PHV917(M), 6214 y 6227 con la proteína NS3 de genotipo 1b.

La primera columna representa un suero del panel con su número de identificación ID.

Cada antígeno (E2, NS3, NS4B, NS5a) se mide individualmente y está representado en las columnas siguientes. La última columna representa los resultados en detección de antígenos con el anticuerpo 19D9D6.

25

Tabla 1:

ID	E2	NS3	NS4B	NS5A	19D9D6
PHV908-1	0,5	0,7	0,6	0,3	0,1
PHV908-2	0,7	0,9	0,6	0,4	0,0
PHV908-3	0,5	0,7	0,8	0,5	0,2
PHV908-4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,2
PHV908-5	0,8	0,5	0,4	0,3	0,3
PHV908-6	1,2	0,4	0,3	0,2	0,0
PHV908-7	1,7	0,4	0,2	0,0	0,1
PHV908-8	2,2	0,5	0,3	0,2	0,1
PHV908-9	2,0	0,6	0,3	0,3	0,1
PHV908-10	2,2	0,9	0,5	0,3	0,2
PHV908-11	1,7	1,0	0,5	0,3	0,0
PHV908-12	1,3	0,8	0,4	0,7	0,2
PHV908-13	1,3	1,0	0,5	0,3	0,1

ES 2 497 016 T3

Tabla 2:

ID	E2	NS3	NS4B	NS5A	19D9D6
PHV 910(M)-2	1,6	0,8	0,9	0,4	0,0
PHV 910(M)-3	11,8	0,8	0,8	0,3	0,1
PHV 910(M)-4	18,0	0,7	2,7	0,3	0,3
PHV 910(M)-5	22,6	1,0	17,3	0,7	0,1

Tabla 3:

ID	E2	NS3	NS4B	NS5A	19D9D6
PHV911-2	0,2	0,5	0,7	0,2	0,1
PHV911-3	0,2	0,6	0,7	0,3	0,3
PHV911-4	0,8	9,5	2,0	0,5	0,1
PHV911-5	1,7	17,1	3,7	0,4	0,1

5

Tabla 4:

ID	E2	NS3	NS4B	NS5A	19D9D6
PHV917(M)-1	1,0	1,0	0,7	0,7	0,2
PHV917(M)-3	0,9	0,9	0,8	0,7	0,1
PHV917(M)-4	0,6	0,6	1,3	1,3	0,2
PHV917(M)-5	4,8	1,5	1,1	2,3	0,2
PHV917(M)-6	1,9	3,7	0,9	1,4	0,0
PHV917(M)-7	1,6	6,7	0,7	1,1	0,2
PHV917(M)-8	1,5	7,0	0,7	1,1	0,7
PHV917(M)-9	1,7	29,5	1,5	1,4	3,0
PHV917(M)-10	1,6	32,8	0,8	1,1	1,2

Tabla 5:

ID	E2	NS3	NS4B	NS5A	19D9D6
9044-1	0,4	2,4	0,6	0,4	0,5
9044-2	0,3	2,1	0,5	0,3	0,3
9044-3	0,3	2,0	0,5	0,3	0,3
9044-4	0,4	2,8	0,5	0,4	0,3
9044-5	0,8	6,7	0,5	2,0	0,4
9044-6	1,2	9,5	0,6	7,2	0,3

10

ES 2 497 016 T3

Tabla 6:

ID	E2	NS3	NS4B	NS5A	19D9D6
6212-1	0,6	0,4	0,9	0,5	0,4
6212-2	0,8	0,4	1,0	0,5	0,1
6212-3	0,9	0,4	1,0	0,7	0,1
6212-4	0,5	0,5	0,4	0,3	0,2
6212-5	0,3	0,7	0,7	0,5	0,0
6212-6	0,3	1,4	0,8	0,5	0,2
6212-7	0,1	2,7	0,7	0,6	0,4
6212-8	0,3	15,0	0,9	0,6	0,3
6212-9	0,7	15,0	0,9	0,6	0,3

Tabla 7:

ID	E2	NS3	NS4B	NS5A	19D9D6
6213-1	0,3	0,5	0,7	0,3	0,4
6213-2	0,3	0,5	0,5	0,4	0,3
6213-3	0,4	0,7	0,5	0,3	0,5
6213-4	0,3	0,6	0,5	0,4	0,3
6213-5	0,3	0,5	0,6	0,3	0,2
6213-6	0,3	0,5	0,4	0,3	0,7
6213-7	0,3	0,5	0,4	0,3	0,4
6213-8	0,2	0,3	0,4	0,2	0,6
6213-9	0,3	0,6	0,7	0,3	0,3
6213-10	0,4	1,0	0,6	0,5	0,3
6213-11	0,4	9,7	0,7	0,5	0,4
6213-12	0,4	10,6	0,7	0,4	0,3

5

Tabla 8:

ID	E2	NS3	NS4B	NS5A	19D9D6
6214-1	1,0	0,9	1,1	0,8	0,5
6214-2	1,3	1,2	1,4	0,6	0,6
6214-3	0,8	0,7	0,9	0,5	0,3
6214-4	0,5	0,5	0,9	0,6	0,5
6214-5	0,5	0,4	0,8	0,6	0,3
6214-6	0,1	0,3	0,8	0,7	0,4
6214-7	0,3	0,4	0,9	0,8	0,5
6214-8	0,7	0,6	1,2	0,7	0,7

ES 2 497 016 T3

ID	E2	NS3	NS4B	NS5A	19D9D6
6214-9	1,3	1,0	1,3	0,9	0,4
6214-10	1,7	1,0	1,2	0,7	0,6
6214-11	1,5	1,3	0,9	0,6	0,3
6214-12	1,5	1,1	1,0	0,6	0,6
6214-13	1,5	1,2	1,1	0,7	0,3

Tabla 9:

ID	E2	NS3	NS4B	NS5A	19D9D6
6215-1	0,6	3,3	0,6	0,1	0,3
6215-2	0,6	3,0	0,4	0,1	0,3
6215-3	1,6	3,2	0,8	0,2	0,2
6215-4	0,7	3,1	0,5	0,1	0,2

Tabla 10:

ID	E2	NS3	NS4B	NS5A	19D9D6
6227-1	0,7	0,6	1,0	0,8	0,8
6227-2	0,4	0,4	0,9	0,7	0,7
6227-3	0,9	0,7	1,1	0,8	0,9
6227-4	1,2	0,9	1,2	0,9	0,8
6227-5	1,2	1,0	1,1	0,8	0,6
6227-6	10,6	1,3	1,4	0,8	0,5
6227-7	11,6	0,9	1,2	0,7	0,6

5

Estos ensayos sobre los paneles de seroconversión muestran que el antígeno E2 lleva a una detección más precoz. Sin embargo, el efecto precoz de detección de NS4 aparece en las tablas 2, 3, 4 y 8, el de NS3 aparece en las tablas 5, 6, 7 y 9 y el de NS5 en las tablas 4 y 5.

Ejemplo 3: Ensayo con los antígenos en mezcla E2, NS3 1a, NS3 1b, NS4 y NS5

10 3.1 Formato del ensayo

1. Sensibilización de los pocillos:

15 Los pocillos se sensibilizan durante 1 noche a temperatura ambiente sobre microplacas MaxiSorb de 96 pocillos (Nunc), con 100 microlitros de una solución de los antígenos siguientes en mezcla diluidos en el tampón PBS: E2: 1 microgramo/ml, NS3 de genotipo 1a: 0,5 microgramos/ml, NS3 de genotipo 1b: 0,5 microgramos/ml, NS4B: 1 microgramo/ml, NS5A: 1 microgramo/ml. Las placas se lavan 3 veces con 300 microlitros de TBS-Tween 20 0,05% (tampón de lavado) y después se pasivan durante 2 horas a 37°C en un tampón TBS-Tween 20 0,05%, BSA 20g/l (Sigma), caseína 2,5 g/l. Las placas se lavan 3 veces con 300 microlitros en tampón de lavado.

2. Incubación de la muestra

20 Los pocillos se incuban con 100 microlitros de muestra diluidos al 1/100 en tampón de pasivación durante 1 hora a 37°C, después se lavan 3 veces con 300 microlitros de tampón de lavado.

3. Incubación de los conjugados

Los pocillos se incuban durante 1 hora a 37°C con 100 microlitros de una solución de anti-IgG humanas conjugado con una enzima de peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Immunoresearch) diluido en 0,1 microgramo/ml y anti-IgM humanas (bioméieux) diluida en 0,025 microgramos/ml en tampón de pasivación. Los pocillos se lavan 3 veces con 300 microlitros de tampón de lavado.

5 4. Revelación

La reacción se revela con 100 microlitros de un sustrato O-fenilendiamina (Calbiochem) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se detiene mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 0,5 M. La señal se lee sobre un lector de microplacas a 492 nm. El valor límite se calcula a partir de la señal dada por la media de 3 muestras negativas a las que se añade 3 veces la desviación estándar de esta señal. El resultado puede expresarse en relación señal/límite (s/co); un s/co superior a 1 se interpreta como positivo.

3.2 Resultados sobre los paneles de seroconversión

La precocidad de la detección utilizando el formato de ensayo con los antígenos en mezcla se evalúa con 11 paneles de seroconversión proporcionados por Zeptometrix Corp (panel HCV9044, 6212, 6213, 6214, 6215 y 6227) y Seracare/BBI diagnostics (paneles PHV907, PHV908, PHV(910(M), PHV911 y PHV917(M)). Las muestras son unos plasmas procedentes de extracciones longitudinales de personas infectadas por el VHC. Los resultados se expresan en señal/límite; los valores superiores a 1 son considerados positivos. La primera columna indica el código de identificación para la muestra. La segunda columna el número de días desde la extracción inicial para un mismo paciente (extracciones longitudinales). La tercera columna indica el resultado expresado en señal/límite obtenida con un kit comercial Ortho EIA 3.0 que es un kit comercial de detección precoz de la seroconversión para el VHC que utiliza un péptido de Core (C22-3) y un polipéptido de NS4-NS4 (C200). La cuarta columna indica el resultado expresado en señal/límite con los antígenos en mezcla. Cada tabla corresponde a una serie de extracciones para un mismo paciente.

Tabla 11:

ID	Días	Ortho EIA s/co	E2+NS3+NS4B+NS5A s/co
PHV907-1	0	0	0,4
PHV907-2	4	0	0,3
PHV907-3	7	0	0,4
PHV907-4	13	0,1	0,4
PHV907-5	18	0,4	0,6
PHV907-6	21	1	1,3
PHV907-7	164	4,4	6,1

25

Tabla 12:

ID	Días	Ortho EIA s/co	E2+NS3+NS4B+NS5A s/co
PHV908-01	0	0	0,3
PHV908-02	3	0	0,5
PHV908-03	5	0	0,5
PHV908-04	11	0,1	0,8
PHV908-05	13	0,3	0,9
PHV908-06	19	1,7	1,3
PHV908-07	25	4,9	1,8
PHV908-08	27	4,9	1,7
PHV908-09	32	>5	2,0

ES 2 497 016 T3

PHV908-10	35	>5	2,5
PHV908-11	41	>5	2,4
PHV908-12	45	>5	2,9
PHV908-13	48	>5	2,6

Tabla 13:

ID	Días	Ortho EIA s/co	E2+NS3+NS4B+NS5A s/co
910-2	4	0	1,0
910-3	8	2,1	1,4
910-4	11	>5	2,2
910-5	15	>5	5,6

Tabla 14:

ID	Días	Ortho EIA s/co	E2+NS3+NS4B+NS5A s/co
PHV911-02	3	0.0	0,5
PHV911-03	14	1.6	0,4
PHV911-04	21	>5.0	3,3
PHV911-05	24	>5.0	5,2

5

Tabla 15:

ID	Días	Ortho EIA s/co	E2+NS3+NS4B+NS5A s/co
917-1	0	0	0,5
917-3	20	0	0,6
917-4	22	0	0,5
917-5	85	>4,7	1,1
917-6	131	>4,8	1,7
917-7	135	>4,9	2,0
917-8	138	>4,10	2,4
917-9	146	>4,11	4,9
917-10	152	>4,12	5,5

ES 2 497 016 T3

Tabla 16:

ID	Días	Ortho EIA s/co	E2+NS3+NS4B+NS5A s/co
9044-1	0	0,005	1,2
9044-2	4	0,003	0,6
9044-3	17	0,003	0,6
9044-4	21	0,124	0,8
9044-5	25	1,364	1,8
9044-6	29	1,864	3,3

Tabla 17:

ID	Días	Ortho EIA s/co	E2+NS3+NS4B+NS5A s/co
6212-1	0	0,003	0,2
6212-2	12	0,149	0,3
6212-3	14	0,297	0,2
6212-4	23	1,489	0,3
6212-5	26	1,866	0,4
6212-6	32	2,369	0,8
6212-7	37	2,461	1,0
6212-8	51	4,132	5,7

5

Tabla 18:

ID	Días	Ortho EIA s/co	E2+NS3+NS4B+NS5A s/co
6213-1	0	0,015	0,4
6213-2	2	0,012	0,2
6213-3	8	0,01	0,3
6213-4	11	0,009	0,3
6213-5	15	0,061	0,3
6213-6	17	0,009	0,2
6213-7	27	0,007	0,2
6213-8	29	0,009	0,7
6213-9	34	0,02	1,4
6213-10	36	0,51	1,4
6213-11	42	4,126	2,9
6213-12	46	4,126	3,3

Tabla 19:

ID	Días	Ortho EIA s/co	E2+NS3+NS4B+NS5A s/co
6215-1	0	0,01	0,4
6215-2	3	0,01	0,6
6215-3	10	0,01	0,8
6215-4	19	3,05	0,4

Tabla 20:

ID	Días	Ortho EIA s/co	E2+NS3+NS4B+NS5A s/co
6227-1	0	0,029	0,2
6227-2	21	0,067	0,2
6227-3	23	0,028	0,3
6227-4	41	0,042	0,2
6227-5	44	0,028	0,1
6227-6	74	3,686	0,9
6227-7	76	3,73	1,2

5 Estas tablas comparativas entre un kit comercial aceptado FDA y marcado CE, que contiene al menos un epítipo de la proteína Core, y un prototipo de búsqueda muestran que la combinación de antígenos seleccionados en la invención, dan unos resultados muy satisfactorios y mucho más precoces. Se observa siempre una variabilidad inter-pacientes. Por ejemplo la mezcla de antígenos según el ejemplo 3 permite una detección precoz de 8 días en el caso de la tabla 18, pero menos precoz en las tablas 17, 19 ó 20. Por lo tanto, es necesario volver a añadir la
10 detección de antígeno para aumentar la sensibilidad.

Ejemplo 4: detección de los anticuerpos dirigidos contra los epítipos de las proteínas anti-E2, NS3, NS4B y NS5A comparada con la detección del antígeno Core

4.1 Formato del ensayo

1. Formato de detección de los anticuerpos anti-E2, NS3, NS4B y NS5A

15 El protocolo es idéntico al descrito en el ejemplo 3.1, con la misma mezcla de antígenos fijados en el fondo de la placa.

2. Formato de detección del antígeno Core.

El protocolo es idéntico al descrito en el ejemplo 2.1, párrafo 1a

4.2 Resultados sobre 100 sueros HVC positivos sin clasificar

20 Los rendimientos del ensayo se evaluaron sobre 100 muestras de sueros procedentes de extracciones de personas infectadas por el VHC.

De los 100 sueros ensayados, 2 sueros 57544 y 57302 presentan un resultado positivo en detección del antígeno Core y ninguno en detección de los anticuerpos. Estos 2 sueros justifican por lo tanto el principio de un ensayo Combo ya que estos 2 sueros, sin la detección del antígeno, habrían dado un resultado negativo.

Tabla 21:

ID suero	E2+NS3+NS4B+NS5A s/co	Ag Core s/co
57744	0,5	3,0
57302	0,4	3,0

Ejemplo 5: formato del ensayo en modo combinado antígeno y anticuerpo con los antígenos E2, NS4B y NS5A en mezcla con el anticuerpo 19D9D6.

5 5.1. Formato del ensayo:

El esquema del ensayo se describe en la figura 1

1. Sensibilización de los pocillos:

10 Los pocillos son sensibilizados durante 2 horas a 37°C con 100 microlitros de una solución de antígenos (E2, NS4B, NS5A) diluidos cada uno en 1 microgramo/ml en tampón TBS (Tris tamponado con una solución salina), después se lavan con 3x300 microlitros de TBS; y de nuevo se fijan por adsorción pasiva durante 2 horas a 37°C con 200 microlitros de una solución del anticuerpo anti-proteína Core 19D9D6 diluido en 4 microgramos/ml en el tampón TBS. Las placas se lavan 3 veces con 300 microlitros de TBS-Tween 20 0,05% (tampón de lavado), después se pasivan durante una noche a temperatura ambiente en un tampón TBS-Tween 20 0,05%, BSA 20g/l (Sigma), IgG ratón 0,1g/l (Scantibodies laboratory) (tampón de pasivación). Las placas son lavadas 3 veces con 300 microlitros en tampón de lavado.

2. Incubación de la muestra

Los pocillos son incubados con 200 microlitros de muestra diluidas al 1/10 en tampón de pasivación durante 1 hora a 37°C y después se lavan 5 veces con 300 microlitros de tampón de lavado.

20 3. Incubación de los conjugados

Los pocillos son incubados durante 1 hora a 37°C con 200 microlitros de una solución del anticuerpo anti-Core 19D9D6 conjugado con la fosfatasa alcalina diluida en 0,1 microgramo/ml y un Fab' anti-IgG humanos conjugado con la fosfatasa alcalina diluida a 0,05 microgramo/ml en tampón de pasivación. Los pocillos se lavan 5 veces con 300 microlitros de tampón de lavado.

25 4. Revelación

La reacción se revela como en los ejemplos anteriores.

5.2 Resultados

30 La precocidad de la detección utilizando el formato de ensayo con los antígenos en mezcla descrito en el ejemplo 2 se evalúa con 2 paneles de seroconversión proporcionados por Zeptometrix Corp (panel HCV6214) y Seracare BBI diagnostics (panel PHV(910(M))). Las muestras son unos plasmas procedentes de extracciones longitudinales de personas infectadas por el VHC. Los resultados son expresados en señal/límite; los valores superiores a 1 son considerados positivos. La precocidad de la detección se compara con respecto a otros métodos: ensayo de ácidos nucleicos (ensayo Amplicor Roche PCR o ensayo Bayer bDNA 3.0) y Ortho EIA 3.0.

Tabla 22 Panel de seroconversión PHV910(M):

ID	Días	Roche PCR Amplicor	Ortho EIA 3 s/co	Ensayo 5 s/co
910-2	4	>5E+5	0	1,8
910-3	8	>5E+5	2,1	2,5
910-4	11	>5E+5	>5	3,6
910-5	15	>5E+5	>5	5,0

35 Los datos muestran que el ensayo combo detecta la infección 4 días antes que el ensayo comercial Ortho EIA 3. el ensayo de los ácidos nucleicos indica la presencia del virus a partir de la primera muestra.

Tabla 23 Panel de seroconversión 6214:

ID	días	BAYER bDNA Número de copias /ml	Ortho EIA 3 s/co	Ensayo 5 s/co
6214-1	0	6 357 000	0,003	0,4
6214-2	2	6 998 000	0,002	0,3
6214-3	8	8 946 000	0,001	0,3
6214-4	10	6 910 000	0,003	0,3
6214-5	16	5 574 000	0,005	0,3
6214-6	18	3 312 000	0,003	0,3
6214-7	23	5 374 000	0,005	2,2
6214-8	27	11 200 000	0,012	3,5
6214-9	32	9 265 000	0,900	4,1
6214-10	34	6 278 000	2,643	3,9
6214-11	49	2 446 000	4,126	3,9
6214-12	53	2 939 000	4,126	4,0
6214-13	56	2 031 000	4,126	4,5

5 Los datos muestran que el ensayo combo del ejemplo 5 detecta la infección 11 días antes que el ensayo comercial Ortho EIA 3. El ensayo de los ácidos nucleicos (método de referencia) indica la presencia del virus a partir de la primera muestra.

Ejemplo 6: Formato del ensayo en modo combinado antígeno y anticuerpo con los antígenos E2, NS3, NS4B y NS5A mezclados con los anticuerpos 7G9B8 y 7G12A8.

6.1 Formato del ensayo:

El esquema del ensayo se describe en la figura 1

10 1. Sensibilización de los pocillos

15 Los pocillos son sensibilizados durante 2 horas a 37°C con 100 microlitros de una solución de antígenos diluidos cada uno a 1 microgramo/ml en tampón PBS; después se lavan 3 veces con 300 microlitros de PBS; y de nuevo se sensibilizan durante 2 horas a 37°C con 200 microlitros de una solución de los anticuerpos anti-Core 7G9B8 y 7G12A8 diluidos en 0,5 microgramo/ml cada uno en el tampón PBS. Las placas se lavan 3 veces con 300 microlitros de PBS-Tween 20 0,05% (tampón de lavado) y después se pasivan durante una noche a temperatura ambiente en un tampón PBS-Tween 20 0,05%, caseína 1% (tampón de pasivación). Las placas se lavan 3 veces con 300 microlitros en tampón de lavado.

2. Incubación de la muestra

20 Los pocillos son incubados con 200 microlitros de muestra diluidos al 1/3 en tampón TBS-Tween 0,05%, suero de cabra 10% durante 1 hora a 37° y después se lavan 3 veces con 300 microlitros de tampón de lavado.

3. Incubación de los conjugados

25 Los pocillo son incubados durante 1 hora a 37°C con 200 microlitros de una solución de anticuerpos anti-Core 19D9D6 conjugados con la Horseradish-Peroxidasa (HRP) diluidos en 1 microgramo/ml, anti-IgG humanas conjugadas (HRP) diluidas en 0,1 microgramo/ml, anti-IgM humanas conjugadas (HRP) diluidas en 0,1 microgramo/ml en tampón de pasivación. Los pocillos se lavan 3 veces con 300 microlitros de tampón de lavado.

4. Revelación

La reacción se revela con 100 microlitros de un sustrato O-fenilendiamina (Calbiochem) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se detiene mediante adición de 50 microlitros de H₂SO₄ 0,5M. La señal se lee sobre un lector de microplacas a 492 nm.

6.2 Resultados sobre los paneles de seroconversión

5 La precocidad de la detección se evalúa con 11 paneles de seroconversión proporcionados por Zeptometrix Corp (panel HCV9044, 6212, 6213, 6214, 6215 y 6227) y Seracare BBI diagnostics (paneles PHV 907, PHV908, PHV910(M), PHV911 y PHV917(M)). Las muestras son unos plasmas procedentes de extracciones longitudinales de personas infectadas por el VHC. El valor límite se calcula a partir de la señal dada por la media de 3 muestras negativas adicionado de 3 veces la desviación típica de esta señal. El resultado puede ser expresado en la proporción señal/límite (s/co); un s/co superior a 1 se interpreta como positivo.

Tabla 24:

ID	días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
PHV907-1	0	0	1,4
PHV907-2	4	0	1,3
PHV907-3	7	0	1,2
PHV907-4	13	0,1	1,4
PHV907-5	18	0,4	1,4
PHV907-6	21	1	1,6
PHV907-7	164	4,4	1,9

10

Tabla 25:

ID	días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
PHV908-01	0	0	1,1
PHV908-02	3	0	0,9
PHV908-03	5	0	1,1
PHV908-04	11	0,1	1,1
PHV908-05	13	0,3	1,4
PHV908-06	19	1,7	1,5
PHV908-07	25	4,9	1,6
PHV908-08	27	4,9	1,7
PHV908-09	32	>5	1,3
PHV908-10	35	>5	1,5
PHV908-11	41	>5	1,4
PHV908-12	45	>5	1,6

Tabla 26:

ID	días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
910-2	4	0	1,5
910-3	8	2,1	1,6

ES 2 497 016 T3

910-4	11	>5	1,9
910-5	15	>5	1,8

Tabla 27:

ID	días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
PHV911-02	3	0,0	0,8
PHV911-03	14	1,6	1,0
PHV911-04	21	>5,0	1,7
PHV911-05	24	>5,0	1,7

Tabla 28:

ID	días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
917-1	0	0	1,4
917-3	20	0	1,0
917-4	22	0	1,2
917-5	85	>4,7	1,2
917-6	131	>4,8	1,4
917-7	135	>4,9	1,4
917-8	138	>4,10	1,5
917-9	146	>4,11	1,7

5

Tabla 29:

ID	días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
9044-1	0	0,005	1,1
9044-2	4	0,003	1,1
9044-3	17	0,003	1,3
9044-4	21	0,124	1,1
9044-5	25	1,364	1,3
9044-6	29	1,864	1,4

Tabla 30:

ID	días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
6212-1	0	0,003	0,8
6212-2	12	0,149	1,0
6212-3	14	0,297	0,8
6212-4	23	1,489	1,1
6212-5	26	1,866	1,0
6212-6	32	2,369	1,1
6212-7	37	2,461	1,3
6212-8	51	4,132	1,6
6212-9	53	4,132	1,4

Tabla 31:

ID	Días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
6213-1	0	0,015	1,3
6213-2	2	0,012	1,3
6213-3	8	0,01	1,5
6213-4	11	0,009	1,3
6213-5	15	0,061	1,1
6213-6	17	0,009	1,4
6213-7	27	0,007	1,2
6213-8	29	0,009	1,3
6213-9	34	0,02	1,3
6213-10	36	0,51	1,2
6213-11	42	4,126	1,7
6213-12	46	4,126	1,5

5

Tabla 32:

ID	días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
6214-1	0	0,003	1,1
6214-2	2	0,002	1,2
6214-3	8	0	1,0
6214-4	10	0,003	1,2
6214-5	16	0,005	1,0

ES 2 497 016 T3

ID	días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
6214-6	18	0,003	1,0
6214-7	23	0,005	1,1
6214-8	27	0,012	1,1
6214-9	32	0,9	1,3
6214-10	34	2,643	1,2
6214-11	49	4,126	1,7
6214-12	53	4,126	1,8

Tabla 33:

ID	días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
6215-1	0	0,01	0,7
6215-2	3	0,01	0,7
6215-3	10	0,01	1,2
6215-4	19	3,05	0,9

Tabla 34:

ID	Días	Ortho EIA s/co	Ensayo 6
6227-1	0	0,029	0,7
6227-2	21	0,067	0,6
6227-3	23	0,028	0,6
6227-4	41	0,042	1,1
6227-5	44	0,028	1,0
6227-6	74	3,686	1,3
6227-7	76	3,73	1,5

5

La combinación utilizada en el ensayo 6 da mejores resultados que el ensayo Ortho para la mayoría de los paneles y detecta con al menos la misma sensibilidad para las tablas 27 y 30.

Bibliografía

Alter M.J. *et al.*, N. Engl. J. Med., 1992, 327, 1899-1905.

10 Arribillaga L. *et al.*, Vaccine , 2002, 21, 202-210.

Cheyne V. *et al.*, Prot. Expr. Purif., 1993, 4(5), 367-472.

Choo Q.L. *et al.*, Science, 1989, 244, 359-362.

Choo Q.L. *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 2451-2455.

Courouce AM *et al.*, Lancet, 1994, 343, 853-854.

Garson JA *et al.*, Lancet. 1990, 336, 1022-1025.

Gretch D.R. *et al.*, Anal. Biochem, 1987, 163, 270-277.

Han J.H. *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1991, 88(5), 1711-1715.

5 Jolivet-Reynaud C. *et al.*, Journal of Medical Virology, 1998, 56, 300-309.

Kato N. *et al.*, Virus Res., 1992, 22, 107-123.

Köhler G. y Milstein C., Nature, 1975, 256, 45-47.

Köhler G. y Milstein C., Eur. J. Immunology, 1976, 6, 511-519.

Ménez A. *et al.*, J. Immunology, 2003, 170, 1917-1924.

10 Mimms L. *et al.*, Lancet, 1990, 336, 1590-1591.

Takahashi K. *et al.*, J. Gen. Virol., 1992, 73, 667-672.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> bioMérieux

<120> Soporte sólido de detección del VHC

15 <130> HCV Combo

<150> FR0951949

<151> 2009-03-30

<160> 16

<170> Patent In version 3.3

20 <210> 1

<211> 302

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> E2 clonado del VHC

<400> 1

ES 2 497 016 T3

Met Arg Gly Ser His His His Thr His Val Thr Gly Gly Arg Val Ala
1 5 10 15

Ser Ser Thr Gln Ser Leu Val Ser Trp Leu Ser Gln Gly Pro Ser Gln
20 25 30

Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr
35 40 45

Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Ile Ala Ala Leu
50 55 60

Phe Tyr Ala His Arg Phe Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gu Arg Met Ala
65 70 75 80

Ser Cys Arg Pro Ile Asp Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr
85 90 95

His Val Val Pro Asn Ile Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr
100 105 110

Ala Pro Gln Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro
115 120 125

Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg
130 135 140

Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Gu Asn Gu Thr Asp Val Leu
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr
165 170 175

Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys
180 185 190

Asn Ile Gly Gly Val Gly Asn Asn Thr Leu Ile Cys Pro Thr Asp Cys
195 200 205

Phe Arg Lys His Pro Gu Ala Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro
210 215 220

Trp Leu Thr Pro Arg Cys Leu Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His
225 230 235 240

Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val
245 250 255

Gly Gly Val Gu His Arg Leu Asn Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly
260 265 270

Gu Arg Cys Asp Leu Gu Asp Arg Asp Arg Ser Gu Leu Ser Pro Leu
275 280 285

Leu Leu Ser Thr Thr Gu Trp Gln His His His His His His
290 295 300

<210> 2

<211> 288

5 <212> PRT

ES 2 497 016 T3

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 2

H i s Val Thr G y G y Arg Val Al a Ser Ser Thr G n Ser Leu Val Ser
 1 5 10 15
 T r p Leu Ser G n G y Pro Ser G n Lys I l e G n Leu Val Asn Thr Asn
 20 25 30
 G y Ser T r p H i s I l e Asn Arg Thr Al a Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu
 35 40 45
 G n Thr G y Phe I l e Al a Al a Leu Phe Tyr Al a H i s Arg Phe Asn Al a
 50 55 60
 Ser G y Cys Pro G u Arg M e t Al a Ser Cys Arg Pro I l e Asp Lys Phe
 65 70 75 80
 Al a G n G y T r p G y Pro I l e Thr H i s Val Val Pro Asn I l e Ser Asp
 85 90 95
 G n Arg Pro Tyr Cys T r p H i s Tyr Al a Pro G n Pro Cys G y I l e Val
 100 105 110
 Pro Al a Ser G n Val Cys G y Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro
 115 120 125
 Val Val Val G y Thr Thr Asp Arg Ser G y Val Pro Thr Tyr Ser T r p
 130 135 140
 G y G u Asn G u Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro
 145 150 155 160
 G n G y Asn T r p Phe G y Cys Thr T r p M e t Asn Ser Thr G y Phe Thr
 165 170 175
 Lys Thr Cys G y G y Pro Pro Cys Asn I l e G y G y Val G y Asn Asn
 180 185 190
 Thr Leu I l e Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys H i s Pro G u Al a Thr
 195 200 205
 Tyr Thr Lys Cys G y Ser G y Pro T r p Leu Thr Pro Arg Cys Leu Val
 210 215 220
 Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu T r p H i s Tyr Pro Cys Thr I l e Asn Phe Thr
 225 230 235 240
 I l e Phe Lys Val Arg M e t Tyr Val G y G y Val G u H i s Arg Leu Asn
 245 250 255
 Al a Al a Cys Asn T r p Thr Arg G y G u Arg Cys Asp Leu G u Asp Arg
 260 265 270
 Asp Arg Ser G u Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr G u T r p G n
 275 280 285

5 <210> 3

<211> 287

ES 2 497 016 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> NS3 1b clonado del VHC

5 <400> 3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Val Asp Gu Ser
1 5 10 15

Met Asp Gu Phe Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Gu Ser Met Gu Thr
20 25 30

Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala Val
35 40 45

Pro Gn Thr Phe Gn Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly
50 55 60

Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gn Gly Tyr Lys Val

ES 2 497 016 T3

G n Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gy Ser Gy Lys Ser Thr Lys
 35 40 45

Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala G n Gy Tyr Lys Val Arg Val Leu Asn
 50 55 60

Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gy Phe Gy Ala Tyr Met Ser Lys Ala
 65 70 75 80

His Gy Ile Gu Pro Asn Ile Arg Thr Gy Val Arg Thr Ile Thr Thr
 85 90 95

Gy Gy Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gy Lys Phe Leu Ala Asp Gy
 100 105 110

Gy Oys Ser Gy Gy Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Oys Asp Gu Oys His
 115 120 125

Ser Thr Asp Trp Thr Thr Ile Leu Gy Ile Gy Thr Val Leu Asp G n
 130 135 140

Ala Gu Thr Ala Gy Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro
 145 150 155 160

Pro Gy Ser Ile Thr Val Pro His Pro Asn Ile Gu Gu Val Ala Leu
 165 170 175

Ser Asn Thr Gy Gu Ile Pro Phe Tyr Gy Lys Ala Ile Pro Ile Gu
 180 185 190

Ala Ile Lys Gy Gy Arg His Leu Ile Phe Oys His Ser Lys Lys Lys
 195 200 205

Oys Asp Gu Leu Ala Ala Lys Leu Thr Gy Leu Gy Leu Asn Ala Val
 210 215 220

Ala Tyr Tyr Arg Gy Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gy Asp
 225 230 235 240

Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gy Phe Thr Gy Asp
 245 250 255

Phe Asp Ser Val Ile Asp Oys Asn Thr Oys Val
 260 265

<210> 5

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 5

Gy Gu Gy Ala Val G n Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala Ser
 1 5 10 15

Arg Gy Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Gu Ser Asp
 20 25 30

<210> 6

ES 2 497 016 T3

<211> 113

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> NS5A clonado del VHC

<400> 6

Met Ala Ser Lys Ala Thr Cys Thr Thr His His Asp Ser Pro Asp Ala
1 5 10 15

Asp Leu Ile Gu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Gu Met Gly Gly Asn
20 25 30

Ile Thr Arg Val Gu Ser Gu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe
35 40 45

Asp Pro Leu Arg Ala Gu Gu Asp Gu Arg Gu Val Ser Val Ala Ala
50 55 60

Gu Ile Leu Arg Lys Ser Lys Lys Phe Pro Pro Ala Leu Pro Ile Trp
65 70 75 80

Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu Gu Ser Trp Lys Ser Pro
85 90 95

Asp Tyr Val Pro Pro Ala Val Met Arg Gly Ser His His His His His
100 105 110

His

<210> 7

<211> 100

10 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 7

Lys Ala Thr Cys Thr Thr His His Asp Ser Pro Asp Ala Asp Leu Ile
1 5 10 15

Gu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Gu Met Gly Gly Asn Ile Thr Arg
20 25 30

Val Gu Ser Gu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu
35 40 45

Arg Ala Gu Gu Asp Gu Arg Gu Val Ser Val Ala Ala Gu Ile Leu

ES 2 497 016 T3

50

55

60

Arg Lys Ser Lys Lys Phe Pro Pro Ala Leu Pro Ile Trp Ala Arg Pro
65 70 75 80

Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu Gu Ser Trp Lys Ser Pro Asp Tyr Val
85 90 95

Pro Pro Ala Val
100

<210> 8

<211> 287

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> NS3 1a clonado del VHC

<400> 8

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Val Asp Gu Ser
1 5 10 15

Met Asp Gu Phe Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Gu Asn Leu Gu Thr
20 25 30

Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala Val
35 40 45

Pro Gn Ser Tyr Gn Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly
50 55 60

Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gn Gly Tyr Lys Val
65 70 75 80

Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr
85 90 95

Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg
100 105 110

Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe
115 120 125

Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys
130 135 140

Asp Gu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr
145 150 155 160

Val Leu Asp Gn Ala Gu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val Leu Ala
165 170 175

ES 2 497 016 T3

Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Gu
 180 185 190

Gu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Gu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala
 195 200 205

Ile Pro Leu Gu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His
 210 215 220

Ser Lys Lys Lys Cys Asn Gu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly
 225 230 235 240

Val Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro
 245 250 255

Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly
 260 265 270

Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val
 275 280 285

<210> 9

<211> 267

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 9

Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Gu Asn Leu Gu Thr Thr Met Arg Ser
 1 5 10 15

Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala Val Pro Gn Ser Tyr
 20 25 30

Gn Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys
 35 40 45

Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gn Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn
 50 55 60

Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala
 65 70 75 80

His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr
 85 90 95

Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly
 100 105 110

Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Gu Cys His
 115 120 125

Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gn
 130 135 140

ES 2 497 016 T3

Ala 145 G u Thr Ala 150 G y Ala 150 Arg Leu Thr Val 155 Leu Ala Thr Ala Thr Pro 160
 Pro 165 G y Ser Val Thr 165 Val Pro His Pro 170 Asn Ile G u G u Val Ala Leu 175
 Ser Thr Thr 180 G y G u Ile Pro Phe Tyr 185 G y Lys Ala Ile Pro 190 Leu G u
 Ala Ile Lys 195 G y G y Arg His 200 Leu Ile Phe Cys His 205 Ser Lys Lys Lys
 Cys 210 Asn G u Leu Ala Ala 215 Lys Leu Val Ala Leu 220 G y Val Asn Ala Val
 Ala 225 Tyr Tyr Arg G y Leu 230 Asp Val Ser Val 235 Ile Pro Thr Ser G y Asp 240
 Val Val Val Val 245 Ala Thr Asp Ala Leu 250 Met Thr G y Phe Thr G y Asp 255
 Phe Asp Ser 260 Val Ile Asp Cys Asn Thr 265 Cys Val

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> epítopo

<400> 10

G n 1 Asp Val Lys 5 Phe 5

10 <210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> epítopo

<400> 11

G n 1 Ile Val G y G y 5

<210> 12

<211> 8

20 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> epítopo
 <400> 12
 Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile
 1 5
 <210> 13
 5 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> epítopo
 10 <400> 13
 Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu
 1 5
 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> epítopo
 <400> 14
 Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5
 20 <210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 25 <223> epítopo
 <400> 15
 Val Tyr Leu Leu Pro Arg
 1 5
 <210> 16
 <211> 14
 30 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> epítopo
 <400> 16

ES 2 497 016 T3

Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC en el que se fijan:
- a) al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína Core de VHC, y
 - b) un polipéptido que consiste en (i) un péptido de la proteína E2 del VHC seleccionado entre la proteína E2 en sí misma y uno o varios de sus epítomos, y (ii) un péptido de las proteínas E1, NS4B y/o NS5A del VHC seleccionado entre las proteínas en sí mismas y uno o varios de sus epítomos y, llegado el caso, en (iii) un péptido de la proteína NS3 seleccionado entre la proteína en sí misma y uno o varios de sus epítomos,
- entendiéndose que ningún polipéptido que comprende un epítomo de la proteína Core del VHC está fijado sobre el soporte sólido.
2. Soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC según la reivindicación 1, caracterizado por que el péptido (ii) se selecciona entre las proteínas NS4B, NS5A y uno o varios de sus epítomos.
3. Soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC según la reivindicación 2, caracterizado por que el péptido (ii) comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia SEC ID nº 5 y/o de la SEC ID nº 7.
4. Soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC según la reivindicación 1 a 3, caracterizado por que el péptido (i) comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia SEC ID nº 2.
5. Soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC según la reivindicación 1 a 4, caracterizado por que el polipéptido b) no comprende ningún péptido (iii).
6. Soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC, en el que están fijados:
- a) al menos un anticuerpo dirigido contra la proteína de Core del VHC,
 - b) un péptido de la proteína E2 del VHC seleccionado entre la proteína E2 en sí misma o uno o varios de sus epítomos y
 - c) un péptido de las proteínas E1, NS4B y/o NS5A del VHC seleccionado entre las proteínas en sí mismas y uno o varios de sus epítomos, con, llegado el caso
 - d) un péptido de la proteína NS3 seleccionado entre la proteína en sí misma y uno o varios de sus epítomos.
- entendiéndose que ningún polipéptido que comprende un epítomo de la proteína Core del VHC está fijado sobre el soporte sólido.
7. Soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC según la reivindicación 6, caracterizado por que el péptido c) se selecciona entre las proteínas NS4B, NS5A y uno o varios de sus epítomos.
8. Soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC según la reivindicación 7, caracterizado por que el péptido c) comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia SEC ID nº 5 y/o SEC ID nº 7.
9. Soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC según la reivindicación 6 a 8, caracterizado por que el péptido b) comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia SEC ID nº 2.
10. Soporte sólido de ensayo inmunológico para la detección del VHC según la reivindicación 6 a 9, el cual no comprende ningún péptido de la proteína NS3 d).
11. Procedimiento de detección *in vitro* de una infección por el VHC en una muestra biológica que comprende la detección de al menos un antígeno del VHC y de un anticuerpo dirigido contra el VHC presente en la muestra biológica, y en el que
- se dispone de un soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,
- se incuba dicho soporte con la muestra biológica en condiciones que permiten la formación de complejos antígeno-anticuerpos,
- se revelan los complejos antígenos-anticuerpos formados.

Fig 1



