

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 586**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/08** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009 E 15000082 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2862876**

54 Título: **Anticuerpo que se une a la proteína de envoltura 2 del virus de la hepatitis C y método para identificar el genotipo del virus de la hepatitis C utilizando el mismo**

30 Prioridad:

**30.09.2008 JP 2008254338**

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

**23.03.2016**

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (50.0%)**  
**1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku**  
**Tokyo 103-8666, JP y**  
**JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR**  
**GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF**  
**INFECTIOUS DISEASES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WAKITA, TAKAJI;**  
**AKAZAWA, YUKO y**  
**NAKAMURA, NORIKO**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Luis Alfonso**

**ES 2 564 586 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

Anticuerpo que se une a la proteína de envoltura 2 del virus de la hepatitis C y método para identificar el genotipo del virus de la hepatitis C utilizando el mismo

5

Sector técnico

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a la proteína de envoltura 2 del virus de la hepatitis C y a un método para identificar el genotipo del virus de la hepatitis C utilizando dicho anticuerpo.

10

Técnica anterior

El virus de la hepatitis C (que, a continuación, se puede denominar también "VHC") es el virus principal causante de las hepatitis no A y no B, que infecta principalmente a través de la transfusión y el contacto sexual (Choo y otros, Science, Vol. 244: 359-362, 1989). Se ha estimado que hay 2.000.000 o más de portadores del VHC en Japón, incluyendo aquellos que no muestran síntomas de la hepatitis (portadores de virus), y que hay 170.000.000 o más de portadores del VHC en el mundo. Las causas principales para el aumento del número de portadores del VHC son el hecho de que la tasa de cronicidad de la hepatitis debida a la infección por VHC alcanza del 70% al 80%, y el hecho de que no existen agentes antivirales eficaces aparte de los interferones.

15

20

Casi con toda seguridad, los estados patológicos mostrados por la mitad o más de los pacientes con hepatitis C crónica irán a peor y se sabe que progresan a cirrosis o cáncer de hígado. Por lo tanto, se puede decir que la hepatitis C es una enfermedad infecciosa grave con un mal pronóstico. Por lo tanto, los estudios relativos al tratamiento de la hepatitis C y la detección del VHC son médicamente importantes, y se desea el desarrollo de nuevas terapias y fármacos terapéuticos.

25

El VHC es un virus de ARN (+) monocatenario que tiene una longitud genómica de aproximadamente 9,6 kb, en el que el genoma codifica una proteína precursora que se convierte en 10 tipos de proteínas del virus (es decir, proteínas del núcleo, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) a través de la escisión postraduccional mediante peptidasa señal derivada del anfitrión o proteasas derivadas del VHC. El VHC se clasifica en 10 o más genotipos (por ejemplo, 1a, 1b, 2a, 2b, 3a y 3b) de acuerdo con el análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos del genoma (Choo y otros, Science, 1989, Vol. 244, págs. 359-362; Simmonds y otros, Hepatology, 1994, Vol. 10, págs. 1.321-1.324; Okamoto y otros, J. Gen. Virol., 1992, Vol. 73, págs. 73-679; y Mori y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, Vol. 183, págs. 334-342).

30

35

Recientemente, se ha dado a conocer que los efectos de los interferones varían significativamente dependiendo del genotipo del VHC. Se ha descubierto que la acción antiviral de los interferones se ejerce con dificultad sobre el VHC de genotipo 1a o 1b (Fried y otros, N. Engl. J. Med., 2002, Vol. 347, págs. 975-982 y Lusida y otros, J. Clin. Microbiol., 2001, Vol. 39, págs. 3.858-3.864).

40

Además, se ha dado a conocer que la acción antiviral de los interferones se ejerce de manera diferente sobre el VHC de genotipo 2a y el VHC de genotipo 2b, sobre los que los interferones tienen efectos relativamente buenos. Se ha sugerido que los interferones ejercen su acción antiviral más significativamente sobre el VHC de genotipo 2a que sobre el VHC de genotipo 2b (Murakami y otros, Hepatology, 1.999, Vol. 30, págs. 1.045-1.053).

45

Es conocida una prueba de anticuerpos del VHC como un método de diagnóstico del VHC por el que se detecta un anticuerpo anti-VHC en suero utilizando un antígeno C100-3, ya que el anticuerpo anti-VHC que reconoce la región NS4 (antígeno C100-3), que es una región no estructural del VHC, existe en una proporción del 70% -80% en el suero de un paciente con hepatitis C (Choo y otros, Science, 1989, Vol. 244, págs. 359-362). También, como variaciones de este método, se ha desarrollado un sistema de ensayo de anticuerpos de segunda generación, con una sensibilidad de detección que se ha mejorado, utilizando una combinación del antígeno C100-3, un antígeno del núcleo y un antígeno de la región NS3, y un sistema de ensayo de anticuerpos de tercera generación que contiene además un antígeno de la región NS5, además de los antígenos anteriores. Se han utilizado pruebas de anticuerpos del VHC que utilizan estos sistemas de ensayo (Aucella y otros, Blood Purif., 2000, Vol. 18, págs. 110-114).

50

55

Además, aparte de las pruebas de anticuerpos del VHC mencionadas anteriormente, se utiliza una prueba de antígeno del núcleo del VHC (Fabrizi y otros, J. Clin. Microbiol., 2005, Vol. 43, págs. 414-420) para la medición directa de la cantidad de una proteína de núcleo del VHC en el suero y se utiliza una prueba de amplificación de ácido nucleico (NAT) para la confirmación de la presencia o ausencia del genoma del VHC mediante un método de PCR (Velati y otros Euro Serveill., 2005, Vol. 10, págs. 12-14).

60

Sin embargo, las pruebas de anticuerpos del VHC son problemáticas en tanto que, cuando un sujeto ha experimentado la infección por VHC en el pasado, da inevitablemente un resultado positivo para la hepatitis C, incluso después de haberse curado completamente. Las pruebas de anticuerpos del VHC también son problemáticas, ya que un anticuerpo anti-VHC sólo se detecta en la sangre cuando han pasado de 1 a 3 meses

65

después de la infección. Si se lleva a cabo una prueba antes de ese momento, el VHC no puede ser detectado y el sujeto da un resultado negativo para la hepatitis C.

5 Además, las pruebas de antígeno del núcleo del VHC necesitan tratamiento para provocar la liberación de una proteína de núcleo mediante la alteración de la envoltura utilizando SDS, ya que la proteína de núcleo (una molécula diana) está presente dentro de las partículas del VHC. Dependiendo del tiempo de tratamiento con SDS, la proteína de núcleo puede desnaturalizarse o se pueden liberar sustancias que inhiben la reacción antígeno-anticuerpo, alterando de este modo la sensibilidad de detección.

10 Además, aun cuando un sujeto da positivo para el VHC en una prueba de anticuerpos del VHC y una prueba del antígeno de núcleo del VHC, en la actualidad es imposible identificar el genotipo del VHC. Para llevar a cabo la terapia con interferón, deben llevarse a cabo exámenes adicionales, tales como una prueba de amplificación de ácido nucleico, con el fin de identificar el genotipo del VHC. Esto se debe a que la acción antiviral de los interferones difiere significativamente dependiendo del genotipo del VHC. Particularmente en el genotipo 1a del VHC y el  
15 genotipo 1b del VHC, no se puede ejercer una acción antiviral eficaz y los pacientes, en cambio, sufren los efectos adversos del interferón.

A la vez, una prueba de amplificación de ácido nucleico es problemática debido a la calidad de conservación y la estabilidad insuficientes para las muestras de ensayo, ya que la prueba utiliza ARN de suero de un sujeto como una  
20 molécula diana. La prueba de amplificación de ácido nucleico también presenta diferentes problemas, y las precauciones necesarias en lo que respecta a la utilización de un método de RT-PCR. Por ejemplo, la PCR puede llevarse a cabo después de la transcripción de ARN como una molécula diana de ADN, dando lugar a un resultado de falso negativo debido a la degradación del ARN o la inactivación y/o la inhibición de una transcriptasa inversa, o a un resultado de falso positivo debido a la contaminación cruzada de un sistema de reacción. Por lo tanto, se cree  
25 que la prueba de amplificación de ácido nucleico es inferior en términos de precisión a una prueba de anticuerpos del VHC o una prueba de antígeno del núcleo del VHC que utiliza una proteína como molécula diana.

El documento WO 00/26418 da a conocer una prueba que utiliza un anticuerpo que se une a la proteína de envoltura  
30 2 (E2) del VCH de genotipo 2a pero no reacciona con la E2 del VCH 1a.

Características de la invención

Problema a resolver por la invención

35 Los objetivos de la presente invención son dar a conocer anticuerpos que se unen a las envolturas en las superficies del VHC y se pueden utilizar para la identificación del VHC de genotipo 1a, del VCH de genotipo 1b y del VHC de genotipo 2a, y dar a conocer un método para la identificación de los genotipos del VHC utilizando estos anticuerpos.

Medios para resolver el problema

40 Los presentes inventores llevaron a cabo estudios concentrados con el fin de conseguir los objetivos anteriores. Se obtuvieron hibridomas que producían anticuerpos monoclonales contra la proteína de envoltura 2 del VHC de genotipo 2a como antígeno, obtenido de entre los hibridomas, un anticuerpo que se une de forma específica sólo a la proteína de envoltura 2 del VHC de genotipo 2a, un anticuerpo que se une solamente a la proteína de envoltura 2  
45 del VHC de genotipo 2a y a la proteína de envoltura 2 del VHC de genotipo 1b, y un anticuerpo que se une a la proteína de envoltura 2 del VHC de genotipo 2a, a la proteína de envoltura 2 del VHC de genotipo 1b y a la proteína de envoltura 2 del VHC de genotipo 1a, y de este modo completaron la presente invención.

Además, de forma preferente el anticuerpo anterior se une específicamente a la proteína de envoltura 2 del VHC de  
50 genotipo 2a, pero no reacciona inmunológicamente con la proteína de envoltura 2 del VHC de genotipo 1a y la proteína de envoltura 2 del VHC de genotipo 1b.

El anticuerpo anterior es un anticuerpo que reconoce la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 ó 3 del listado de secuencias como un epítipo. Un ejemplo de este anticuerpo es un anticuerpo que es producido por la  
55 línea celular de hibridoma que tiene el nº de acceso FERM BP-11180 o FERM BP-11179.

Además, la presente invención da a conocer un método para identificar genotipos del VHC, en el que: el genotipo del VHC se determina que es el genotipo 2a si el virus se une a un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma que tiene el nº de acceso FERM BP-11181 y se une a los anticuerpos producidos por las líneas celulares de hibridoma que tienen los nº de acceso FERM BP-11180 y FERM BP-11179.  
60

Efectos de la invención

Según la presente invención, se hace posible la identificación sencilla y muy precisa del VHC de genotipo 2a y se  
65 pueden seleccionar de manera eficiente pacientes de hepatitis C para quienes la terapia con interferón es apropiada. En particular, se pueden aliviar las reacciones adversas y se puede proporcionar la posibilidad de seleccionar un

nuevo método terapéutico a los pacientes de hepatitis C infectados por el VHC de genotipo 1a o 1b, para los que no se puede esperar ningún efecto terapéutico de la terapia con interferón.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra una proteína precursora del VHC. Los cuadrados negros indican las regiones transmembrana.

10 La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra una proteína de fusión de una proteína 3 x FLAG y una proteína E2 antigénica.

La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra una proteína de fusión de una proteína E2 antigénica y un dominio Fc de inmunoglobulina humana.

15 La figura 4 muestra los resultados de SDS-PAGE para cada fracción obtenida en una etapa de purificación de una proteína 3 x FLAGJ6E2dTM. Se muestra la expresión y la purificación de 3 x FLAG-J6E2dTM en las células COS1. La proteína 3 x FLAGJ6E2dTM se detectó en una fracción de elución. Los carriles de la fotografía de electroforesis en la figura 4 indican lo siguiente, respectivamente: 1, marcador de peso molecular; 2, sobrenadante del cultivo; 3, fracción vacía de columna de anticuerpo anti-FLAG; 4, fracción de elución 1 de columna de anticuerpo anti-FLAG; 5, fracción de elución 2 de columna de anticuerpo anti-FLAG; 6, fracción de elución 3 de columna de anticuerpo anti-FLAG; 7, fracción de elución 4 de columna de anticuerpo anti-FLAG; y 8, marcador de peso molecular.

25 La figura 5 muestra los resultados de SDS-PAGE para las proteínas J6E2-Fc, JFH1E2-Fc, THE2-Fc, Con1E2-Fc, J1E2-Fc y H77E2-Fc. Cada tipo de proteína E2 Fc tiene aproximadamente 97 kDa en condiciones reductoras. Se muestra la proteína de fusión purificada de cada proteína E2 antigénica derivada de la cepa del VHC y un dominio Fc de inmunoglobulina humana. Los carriles de la fotografía de electroforesis de la figura 5 indican lo siguiente, respectivamente: 1, marcador de peso molecular; 2, J6E2-Fc; 3, JFH1E2-Fc; 4, THE2-Fc; 5, Con1E2-Fc; 6, J1E2-Fc; 7, H77E2-Fc; y 8, marcador de peso molecular.

30 La figura 6 muestra la propiedad de unión a las proteínas E2 de diferentes genotipos/cepas del VHC y el subtipo de anticuerpo de cada anticuerpo monoclonal. La fuerza de unión de un anticuerpo a una proteína E2 antigénica se indica de - a +++ (-,  $OD_{450\text{ nm}} < 0,1$ ; +,  $0,1 \leq OD_{450\text{ nm}} < 0,25$ ; ++,  $0,25 \leq OD_{450\text{ nm}} < 0,4$ ; +++,  $0,4 \leq OD_{450\text{ nm}}$ ). La figura 6 indica que: 8D10-3 es un anticuerpo que se une a las proteínas E2 antigénicas del VHC de genotipo 1a y del VHC de genotipo 1b y del VHC de genotipo 2a; 1G2-32 y 2F2-7 son anticuerpos que se unen a la proteína E2 antigénica del VHC de genotipo 2a; 4E8-8 es un anticuerpo que se une a las proteínas E2 antigénicas del VHC de genotipo 1b y del VHC de genotipo 2a; M1E12-1 es un anticuerpo monoclonal que se une a la proteína E2 antigénica de la cepa J6CF; y 9A5-4 es un anticuerpo monoclonal que se une a las proteínas E2 antigénicas de la cepa J6CF y de la cepa H77.

40 La figura 7 muestra la fuerza de unión de un anticuerpo monoclonal 8D10-3 (figura 7A), un anticuerpo monoclonal 1G2-32 (figura 7B), un anticuerpo monoclonal 4E8-8 (figura 7C), un anticuerpo monoclonal 2F2-7 (figura 7D) y un anticuerpo monoclonal M1E12-1 (figura 7E) a péptidos que tienen secuencias de aminoácidos derivadas de la proteína E2 antigénica de la cepa J6CF del VHC.

45 La figura 8 muestra la sensibilidad de detección de proteínas E2 antigénicas derivadas de diferentes genotipos del VHC/cepas del VHC, tal como se determina por ELISA sándwich utilizando anticuerpos monoclonales 1G2-32 y 8D10-3. En la figura 8, el círculo negro indica J6E2-Fc, el círculo blanco indica JFH1E2-Fc, el cuadrado negro indica THE2-Fc, el cuadrado blanco indica Con1E2-Fc, el rombo negro indica J1E2-Fc y el rombo blanco indica H77E2-Fc.

50 La figura 9 muestra la presencia o ausencia de proteínas VHCE2 de diferentes genotipos/cepas tal como se detectan mediante un método de transferencia Western utilizando el anticuerpo monoclonal 8D10-3.

Modos de llevar a cabo la invención

55 A continuación, las realizaciones preferentes para la implementación de la presente invención se describirán tal como sigue.

60 El anticuerpo de la presente invención se caracteriza por unirse específicamente a la proteína de envoltura 2 (en adelante, la proteína E2) del VHC de genotipo 2a (en adelante, VHC2a), pero sin reaccionar inmunológicamente con la proteína E2 del VHC de genotipo 1a (en adelante, VHC 1a) y la proteína E2 del VHC de genotipo 1b (en adelante, VHC1b).

65 El anticuerpo anterior se puede preparar mediante la inmunización de un animal con una proteína de antígeno que consiste en la región sin región transmembrana (también denominada dominio transmembrana) de una proteína E2 del VHC o un péptido parcial de la proteína antigénica como antígeno, la preparación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra la proteína E2, y posteriormente la selección de hibridomas que producen un

anticuerpo que se une específicamente a la proteína E2 del VHC2a pero que no reacciona inmunológicamente con la proteína E2 del VHC1a y la proteína E2 del VHC1b.

En la presente memoria descriptiva, la "proteína E2" es una proteína funcional del virus generada mediante la escisión de una proteína precursora del VHC por la peptidasa señal derivada de células del anfitrión y 2 tipos de proteasas codificadas por el propio VHC. Esto se explica utilizando la cepa J6CF del VHC2a como un ejemplo, de tal manera que cuando se determina que la metionina situada en el extremo N-terminal de una proteína precursora es el primer aminoácido, la proteína E2 es una proteína de 367 residuos de aminoácidos que van desde las posiciones de los aminoácidos 384 a 750 de la proteína precursora. Una región de la proteína E2, que va desde las posiciones de aminoácidos 722 a 750, es un dominio transmembrana (Cocquerel y otros, J. Virol., 2000, Vol. 74, págs. 3.623-3.633). La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra una proteína precursora del VHC.

A continuación, se describirán de forma secuencial técnicas para la obtención de los anticuerpos anteriores.

### 1) Selección como antígeno de la proteína o péptido derivados de la proteína E2

Como antígeno para utilizarse en la inmunización de un animal para obtener el anticuerpo anterior, se puede utilizar una proteína que comprende la región de la proteína E2 del VHC2a sin la región transmembrana (en adelante, la proteína E2 antigénica) o un péptido parcial de la proteína (péptido E2 antigénico). Se requiere un péptido E2 antigénico que consista en una región con baja homología con la proteína E2 del VHC de un genotipo distinto al 2a.

Como proteína E2 antigénica, se puede seleccionar una proteína que comprende los aminoácidos 384 a 720 de una proteína precursora del VHC2a (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). Preferentemente, se selecciona una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones de aminoácidos 530 a 562 de la proteína precursora y, más preferentemente, se selecciona una proteína que comprende una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que comprende: la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 465 a 484; la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 559 a 584 y la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 683 a 719 de la proteína precursora.

Además, como péptido E2 antigénico, se puede seleccionar un péptido que comprende los aminoácidos 530 a 562 (más preferentemente, los aminoácidos 531 a 549 y, aún más preferentemente, los aminoácidos 531 a 540) de una proteína precursora del VHC2a (por ejemplo, SEQ ID NO: 5) y que tiene una longitud peptídica de 10 a 19 aminoácidos (más preferentemente, 10 aminoácidos). Más preferentemente, se selecciona un péptido que comprende los aminoácidos 465 a 484 (más preferentemente, los aminoácidos 465 a 477 y, más preferentemente, los aminoácidos 468 a 477) de la proteína precursora y que tiene una longitud peptídica de 10 a 13 aminoácidos (más preferentemente, 10 aminoácidos); un péptido que comprende los aminoácidos 559 a 584 (más preferentemente, los aminoácidos 564 a 576 y, aún más preferentemente, los residuos de aminoácidos en las posiciones 567 a 576) de la proteína precursora y que tiene una longitud peptídica de 10 a 13 aminoácidos (más preferentemente, 10 aminoácidos); o un péptido que comprende los aminoácidos 683 a 719 (preferentemente, los aminoácidos 704 a 719 y, más preferentemente, los aminoácidos 709 a 719) de la proteína precursora y que tiene una longitud peptídica de 10 a 19 aminoácidos (más preferentemente, 10 aminoácidos).

Además, la secuencia de nucleótidos del genoma VHC2a ya se ha descubierto en muchas cepas virales (Yanagi y otros, Virology, 1999, Vol. 262, págs. 250-263) y está disponible en GenBank. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del genoma de la cepa JFH1 del VHC2a se describe en GenBank con el nº de acceso AB047639 y la secuencia de nucleótidos del genoma de la cepa J6CF se describe en GenBank con nº de acceso AF177036.

### 2) Preparación de los péptidos E2 antigénicos

Los péptidos E2 antigénicos seleccionados anteriormente se pueden sintetizar directamente de forma química a partir de la información de la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora del VHC2a. Por ejemplo, un antígeno de este tipo que se puede utilizar para la inmunización de animales se puede preparar fácilmente en una gran cantidad mediante la utilización de un sintetizador de péptidos.

### 3) Preparación de la proteína E2 antigénica

La proteína E2 antigénica seleccionada anteriormente se puede preparar en una gran cantidad como un antígeno que se puede utilizar para la inmunización de animales mediante la síntesis de un fragmento de ADN que codifica la proteína E2 antigénica, a partir de la información de la secuencia de nucleótidos respecto a la región que codifica la proteína precursora del VHC2a y posteriormente la traducción de la proteína E2 antigénica a partir del fragmento de ADN obtenido de este modo en las células. Esto se describirá más específicamente a continuación.

La proteína E2 antigénica se puede producir en las células construyendo un vector de expresión en el que se ha insertado un fragmento de ADN que codifica la proteína E2 antigénica y posteriormente llevando a cabo la transducción en células de mamífero, células de insecto, levadura, *Escherichia coli* o similares. Preferentemente, la proteína se produce mediante expresión secretora por células de mamíferos. En este caso, un fragmento de ADN

que codifica un péptido E2 antigénico se liga dentro del marco de lectura secuencia abajo de la secuencia del péptido señal, de modo que los marcos de lectura de los codones coincidan, y se añade un codón de compleción en el extremo terminal 3', y posteriormente el resultante se puede insertar en un vector de expresión.

5 Entre los ejemplos de células de mamífero para la expresión secretora de una proteína E2 antigénica se incluyen COS-1, COS-7, Vero, CV-1, CHO, CHO deficiente en el gen dhfr, células BHK de hámster, GH3 de rata, feocromocitoma PC12 de rata, células L de ratón, células C127 de ratón, células de mieloma SP2/0, NSO y NS-1 de ratón, células de linfoma de ratón EL4, fibroblastos NIH3T3 y 10T1/2 de ratón, mioblastos de ratón C2C12, células estromales de ratón PA6, ST2, OP9 y Tst-4, células megacarioblásticas humanas CMK, células T humanas Jurkat, células epiteliales renales 293 humanas, células cancerosas hepáticas Huh7, HepG2 e IMY-N9 humanas, células de osteosarcoma humano MG-63, células FL humanas, adipocitos blancos, óvulos y células ES.

15 El ADN que codifica la proteína se inserta bajo el control de un promotor y posteriormente se utiliza para la expresión recombinante de una proteína E2 antigénica en las células. Entre los ejemplos de un promotor de este tipo que se puede utilizar para la expresión recombinante de una proteína E2 antigénica en células de mamífero, se incluyen un promotor SR $\alpha$ , un promotor SV40, un promotor LTR, un promotor CMV, un promotor de actina, un promotor EF-1 $\alpha$  (factor de elongación 1 $\alpha$ ), un promotor de ubiquitina y un promotor PGK (fosfoglicerato quinasa).

20 Entre los ejemplos de un vector de expresión para la expresión secretora de una proteína E2 antigénica en células de mamífero se incluyen pSecTag/FRT/V5-His (Invitrogen Corporation), p3xFLAG-CMV-9 (Sigma), p3xFLAG-CMV13 (Sigma), pFUSE- Fc2 (InvivoGen), y pTriEx-7 (Novagen). Una secuencia de péptido señal incorporada en un vector de expresión es, preferentemente, un péptido señal de preprotipsina. Entre los ejemplos de un vector que tiene la secuencia de péptido señal de preprotipsina se incluyen p3xFLAG-CMV-9 (Sigma) y p3xFLAG-CMV-13 (Sigma). Además, dado que cuando una proteína que contiene un péptido señal se expresa en células de mamífero, el péptido señal se elimina, este péptido señal no plantea ningún problema en la utilización de una proteína E2 antigénica.

30 Después de la expresión secretora de una proteína E2 antigénica en células de mamíferos, la proteína E2 antigénica diana se expresa tal como una proteína de fusión con una proteína de marcaje (por ejemplo, Tag) y entonces la proteína E2 antigénica puede ser detectada y purificada utilizando un anticuerpo contra la proteína de marcaje o una molécula que se une específicamente a la misma. Entre los ejemplos de proteína de marcaje se incluyen un péptido FLAG, un péptido 3xFLAG, un péptido HA, un péptido 3xHA, un péptido myc, un péptido 6xHis, un polipéptido GST, un polipéptido MBP, un polipéptido de dominio PDZ, fosfatasa alcalina, un dominio Fc de inmunoglobulina y avidina. Como proteínas de marcaje que van a utilizarse para la preparación de una proteína E2 antigénica, son adecuados un péptido FLAG, un péptido HA y un dominio Fc de inmunoglobulina, y es más adecuado un dominio Fc de inmunoglobulina.

40 La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra una proteína de fusión de una proteína E2 antigénica y una proteína 3x FLAG. La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra una proteína de fusión de una proteína E2 antigénica y un dominio Fc de inmunoglobulina.

45 Como dominio Fc de inmunoglobulina de este tipo, se puede utilizar un dominio Fc de inmunoglobulina derivado de humano, derivado de mono, derivado de ratón, derivado de rata, derivado de conejo, derivado de hámster o derivado de pollo, y es preferente el dominio Fc de inmunoglobulina derivado de huma n<sup>o</sup> Además, la clase de una cadena pesada de inmunoglobulina del dominio Fc de inmunoglobulina puede ser IgM, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

50 Las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas humanas son como las descritas por Edelman y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1969, Vol. 63, págs. 78-85). Además, la información de la secuencia de nucleótidos de los ADNc de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas humanas está disponible en GenBank (por ejemplo, cadena pesada: n<sup>o</sup> de acceso BX640627). Los cebadores de PCR se diseñan basándose en las secuencias de nucleótidos obtenidas y posteriormente la PCR se lleva a cabo utilizando una biblioteca de ADNc de células de bazo humano o de ADN genómico humano como plantilla, de manera que se puede clonar el ADNc del dominio Fc de inmunoglobulina.

55 Una proteína E2 del VHC se puede ligar directamente a un dominio Fc de inmunoglobulina en un sitio de conexión entre ellos o ligarse al mismo a través de un péptido conector insertado en el mismo. Entre los ejemplos de péptido conector se incluyen Ser-Gly, Asp-Pro, Asp-Pro-Glu, Gly-Asp-Pro-Glu, Gly-Gly-Gly-Ser y (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>x3</sub>.

60 Además, tras la expresión secretora de una proteína E2 antigénica por células de insecto, por ejemplo, células de insecto tales como Sf21, Sf9 y High Five<sup>®</sup> se transdujeron con un vector de expresión utilizando un promotor de polihedrina (cuerpo poliédrico), un promotor p10 o similares. A continuación, se puede expresar la proteína E2 antigénica o una proteína de fusión de la proteína E2 antigénica y una proteína de marcaje.

65 Además, tras la expresión secretora de una proteína E2 antigénica por parte de una levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* o *Pichia pastoris* se transduce con un vector de expresión utilizando un promotor gal1, un promotor gal10, un promotor de proteína de choque térmico, un promotor

MFα1, un promotor PHO5, un promotor PGK, un promotor GAP, un promotor ADH, un promotor AOX1 o similares, y después se puede expresar la proteína E2 antigénica o una proteína de fusión de la proteína E2 antigénica y una proteína de marcaje.

5 Tras la expresión secretora de una proteína E2 antigénica por *Escherichia coli*, por ejemplo, una cepa de *Escherichia coli* tal como la cepa XL1-Blue, la cepa BL-21, la cepa JM107, la cepa TB1, la cepa JM109, la cepa C600 o la cepa HB101 se transforma con un vector de expresión utilizando un promotor trp, un promotor lac, un promotor PL, un promotor T7, un promotor tac o similares y, a continuación, se puede expresar la proteína E2 antigénica o una proteína de fusión de la proteína E2 antigénica y una proteína de marcaje.

10 Entre los ejemplos de método para la transducción con un vector de expresión con el fin de provocar la expresión secretora de una proteína E2 antigénica por células de mamíferos y células de insectos se incluyen un método de lipofección, un método de fosfato de calcio, un método de electroporación, un método de DEAE-dextrano y un método de microinyección. Más específicamente, la transducción se puede llevar a cabo de acuerdo con el método descrito en Molecular Cloning 3ª Ed. 16. 1-16. 62 (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 2001).

15 El método para introducir un vector de expresión dentro de *Escherichia coli* no está particularmente limitado, siempre y cuando se trate de un método para introducir ADN dentro de *Escherichia coli*. Entre los ejemplos de un método de este tipo se incluyen un método que utiliza iones de calcio (Cohen y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 1972, Vol. 69, págs. 2.110-2.114) y un método de electroporación.

20 El método para introducir un vector de expresión en levadura no está particularmente limitado, siempre y cuando se trate de un método para introducir ADN en levadura. Entre los ejemplos de este método se incluyen un método de electroporación (Becker y otros, Methods. Enzymol., 1990, Vol. 194, págs. 182-187), un método de esferoplastos (Hinnen y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 1978, Vol. 75, págs. 1.929-1.933), y un método de acetato de litio (Itoh y otros, J. Bacteriol., 1983, Vol. 153, págs. 163-168).

25 Las células transducidas pueden cultivarse por un método conocido en sí mismo. Como medio para cultivar células de mamífero se utiliza, por ejemplo, medio MEM, medio DMEM, medio RPMI 1640, medio 199 (Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 1950, Vol. 73, pág. 1), que contiene aproximadamente el 5%-20% de suero bovino fetal (FBS) o similares. El pH está comprendido preferentemente entre 6 y 8, aproximadamente. Como medio sin suero, se puede utilizar CD-CHO, 293 SFM-II e hibridoma-SFM (todos estos son producidos por Invitrogen Corporation) y se puede añadir suero o un suplemento al mismo según se requiera. Las células pueden ser cultivadas de 30°C a 40°C durante 15 horas a 60 horas y se lleva a cabo preferentemente aireación o agitación, según se requiera.

30 Después de la compleción del cultivo celular, las células se retiran de una solución de cultivo por centrifugación o similar y posteriormente una proteína E2 antigénica o una proteína de fusión de la proteína E2 antigénica y una proteína de marcaje se pueden purificar a partir del sobrenadante del cultivo obtenido de este modo. La proteína E2 antigénica o la proteína de fusión de la proteína E2 antigénica y la proteína de marcaje se pueden purificar de acuerdo con técnicas de separación y purificación de proteínas conocidas por los técnicos en la materia. Por ejemplo, una proteína se puede aislar y purificar mediante una combinación de cualquiera de los métodos de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares.

35 Por ejemplo, una proteína E2 antigénica en una solución de cultivo se puede purificar fácilmente utilizando una columna de heparina o una columna de lectina. En el caso de una proteína de fusión con un péptido 3xFLAG, la proteína E2 antigénica puede purificarse de forma eficiente utilizando una columna de anticuerpo anti-FLAG, en el caso de una proteína de fusión con un péptido 6xHis, la proteína E2 antigénica puede purificarse de forma eficiente utilizando una columna de níquel, una columna de zinc o una columna de cobalto, en el caso de una proteína de fusión con un dominio Fc de inmunoglobulina, la proteína E2 antigénica puede purificarse de forma eficiente utilizando una columna de proteína A o una columna de proteína G, y en el caso de una proteína quimérica que contiene un péptido HA, la proteína E2 antigénica puede purificarse de forma eficiente utilizando una columna de anticuerpo anti-HA.

40 La proteína E2 antigénica o la proteína de fusión de la proteína E2 antigénica y la proteína de marcaje purificadas de este modo se pueden detectar mediante tinción de azul brillante de Coomassie o tinción con plata después del fraccionamiento de SDS-PAGE. En el caso de la proteína de fusión, la proteína de fusión puede detectarse mediante un método de transferencia Western utilizando un anticuerpo contra la proteína de marcaje fusionada.

45 4) Inmunización utilizando el péptido E2 antigénico o la proteína E2 antigénica

50 Para obtener un anticuerpo que se une específicamente a la proteína E2 del VHC2a, pero que no reacciona inmunológicamente con la proteína E2 del VHC 1a, y más preferentemente no reacciona inmunológicamente ni con la proteína E2 del VHC 1a ni con la proteína E2 del VHC 1b, se debe llevar a cabo la inmunización de animales

55

utilizando el péptido E2 antigénico o la proteína E2 antigénica anteriores y posteriormente obtener un anticuerpo policlonal o cribar los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal de interés.

5 Los animales que deben ser inmunizados pueden ser animales no humanos que tienen células del bazo que pueden utilizarse para la producción de células de hibridoma. Entre los ejemplos de un animal de este tipo se incluyen ratones, ratas, hámsteres, conejos y pollos. Más preferentemente, se pueden utilizar ratones.

10 Un ejemplo de un método para la inmunización comprende administrar varias veces el péptido E2 antigénico o la proteína E2 antigénica anteriores junto con un adyuvante por vía subcutánea o por vía intraperitoneal a ratones de 4 a 10 semanas de edad, confirmar un aumento en el título de anticuerpos en la sangre, aplicar una dosis de refuerzo mediante administración intravenosa o intraperitoneal del péptido E2 antigénico o proteína E2 antigénica solos, y posteriormente recoger la sangre o las células de bazo en los días 3 a 10 (preferentemente en el día 4). Se mide el título de anticuerpos del suero obtenido de la sangre recogida. En este caso, si estos reconocen específicamente el antígeno diana, se pueden utilizar como anticuerpos policlonales.

15 Entre los ejemplos de adyuvante se incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, una mezcla de gel de hidróxido de aluminio y una vacuna de tosferina, Titer Max Gold (Vaxel), y adyuvante Gerbu (Gerbu Biotechnik).

20 El título de anticuerpos en la sangre se mide recogiendo la sangre de un animal inmunizado a través del plexo venoso del fondo de ojo o la vena caudal y posteriormente examinando mediante inmunoensayo enzimático (EIA) la presencia o ausencia de un anticuerpo que reacciona con un péptido E2 antigénico o una proteína E2 antigénica en la sangre obtenida.

25 5) Preparación de células de hibridoma

Las células de bazo recogidas de un animal inmunizado en los días 3-10 después del refuerzo, en el que se ha confirmado un aumento del título de anticuerpos en la sangre, se fusionan con células de mieloma, de modo que se pueden preparar células de hibridoma que tienen replicabilidad autónoma. Un anticuerpo monoclonal se puede preparar en gran cantidad mediante el cribado de las células de hibridoma que producen un anticuerpo que tiene una especificidad de diana.

30 Como células de mieloma para la fusión celular, por ejemplo, pueden utilizarse líneas celulares establecidas derivadas de ratón, P3-X63Ag8-U1 (P3-U1), SP2/0-Ag14 (SP2/0), P3-X63-Ag8653 (653), P3-X63-Ag8 (X63), P3/NS1/1-Ag4-1 (NS1) y similares. Estas líneas celulares están disponibles a través de RIKEN de BioResource Center, ATCC (American Type Culture Collection) o ECACC (European Collection of Cell Cultures).

40 La fusión celular de células de bazo y células de mieloma se lleva a cabo lavando ambas células, mezclando células de mieloma con células de bazo en una proporción de 1:1-10, y posteriormente adicionando polietilenglicol o alcohol polivinílico con un peso molecular promedio de 1.000-6.000 como acelerador de fusión o utilizando un aparato de fusión celular comercial que utiliza estimulación eléctrica (por ejemplo, electroporación).

45 Después de la compleción del tratamiento para la fusión celular, las células fusionadas se suspenden en medio de cultivo y se lavan con el mismo y, posteriormente, se clonan por dilución limitante o un método de formación de colonias en medio de metilcelulosa. Un ejemplo de dilución limitante es un método que comprende diluir hasta un valor de  $10^3$  a  $10^7$  células/ml, sembrar las células en una microplaca de cultivo celular de 96 pocillos a razón de  $10^2$  a  $10^6$  células/pocillo, y posteriormente cultivar las células.

50 Preferentemente, se añade un suplemento HAT al medio de cultivo cuando se lleva a cabo la clonación de las células de hibridoma, a fin de poder obtener de forma selectiva sólo las células de fusión diana. Más específicamente, se obtienen y se clonan células de hibridoma de interés de acuerdo con los métodos descritos en *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) o *Selected Methods in Cellular Immunology* (WH Freeman and Company, 1980).

55 6) Cribado de células de hibridoma

Las células de hibridoma de interés se criban, por ejemplo, mediante un método de EIA que se describe a continuación.

60 Específicamente, en primer lugar, un péptido E2 antigénico o una proteína E2 antigénica se inmovilizan sobre un soporte, se añade un anticuerpo producido por cada célula de hibridoma clonada, para que reaccione durante un tiempo suficiente para la formación de un complejo anticuerpo-antígeno en condiciones de 4°C-37°C.

65 A continuación, un anticuerpo secundario marcado con una enzima, un colorante, un radioisótopo o similar, y capaz de unirse específicamente a una parte del anticuerpo del complejo anticuerpo-antígeno formado de este modo, se

pone en contacto con el complejo anticuerpo-antígeno formado para reaccionar durante un tiempo suficiente para la formación de un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo secundario en condiciones de 4°C-37°C.

5 Por último, se detecta la presencia o ausencia del complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo secundario formado de este modo utilizando señales de una enzima, un colorante o un radioisótopo utilizado para marcar el anticuerpo secundario como indicador, determinando de este modo si es un anticuerpo que tiene las propiedades diana.

#### 7) Preparación del anticuerpo monoclonal

10 Las células de hibridoma seleccionadas por el método anterior se acondicionan en un medio sin suero, por ejemplo, hibridoma-SFM (Invitrogen Corporation) y posteriormente se puede preparar un anticuerpo monoclonal a partir del sobrenadante del cultivo en medio sin suero. Para cultivar células, se pueden utilizar matraces, placas de Petri, botellas de cultivo giratorias, botellas rotatorias o matraces de cultivo de alta densidad CELLline (Becton, Dickinson and Company).

15 Además, con el fin de preparar un anticuerpo monoclonal en gran cantidad, por ejemplo, se puede administrar 0,5 ml de pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) a ratones lampiños o ratones SCIDde 6 a 8 semanas de edad, por vía intraperitoneal, criarlos durante 2 semanas, y posteriormente administrarles por vía intraperitoneal células de hibridoma a razón de  $5 \times 10^6$  a  $2 \times 10^7$  células/ratón y criarlos durante 10 a 21 días, de manera que un anticuerpo monoclonal se puede preparar a partir del líquido ascítico resultante.

20 Las células y los restos celulares se eliminan del líquido ascítico recogido de este modo por centrifugación. Se utilizan medios de purificación tales como desplazamiento salino con sulfato de amonio saturado al 40%-50%, un método de precipitación con ácido caprílico, una columna de DEAE-Sefarosa, una columna de proteína A, una columna de proteína G, una columna HiTrap HP IgM Purification (GE Healthcare), una columna de proteína de unión a manano (Pierce) y una columna de filtración en gel, solos o en combinación, de modo que se recoge una fracción de IgG o IgM y posteriormente se puede utilizar como un anticuerpo monoclonal purificado.

#### 30 8) Análisis de epítipo para el anticuerpo monoclonal

Un epítipo lineal para un anticuerpo monoclonal se puede analizar sintetizando péptidos que tienen secuencias de aminoácidos de 8 a 12 aminoácidos contiguos que se diseñaron para ser desplazados por uno o varios aminoácidos en una proteína E2 antigénica, examinándose a qué péptido se une un anticuerpo monoclonal cuando el péptido se utiliza como un antígeno, y posteriormente determinando un epítipo para el anticuerpo.

35 En concreto, los péptidos sintetizados de este modo se inmovilizan sobre una placa y se hacen reaccionar con un anticuerpo purificado. Se añade un anticuerpo secundario marcado y posteriormente la placa se deja en reposo. La capacidad de unión se mide por inmunoensayo enzimático (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA).

40 En algunos casos, puede no determinarse un epítipo mediante este método. En estos casos, un epítipo para un anticuerpo monoclonal puede ser un epítipo de conformación y, por lo tanto, el anticuerpo puede reconocer la conformación del antígeno.

45 Un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a la proteína E2 del VHC2a, pero que no reacciona inmunológicamente ni con la proteína E2 del VHC1a, es un anticuerpo que reconoce la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias como un epítipo. Un ejemplo específico de un anticuerpo de este tipo es un anticuerpo que se produce a partir de la línea celular de hibridoma que tiene el nº de acceso FERM BP-11181.

50 Además, un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a la proteína E2 del VHC2a, pero que no reacciona inmunológicamente ni con la proteína E2 del VHC1a ni con la proteína E2 del VHC1b, es un anticuerpo que reconoce la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 ó 3 en el listado de secuencias como un epítipo. Un ejemplo específico de un anticuerpo de este tipo es un anticuerpo que se produce a partir de la línea celular de hibridoma que tiene el nº de acceso FERM BP-11180 o FERM BP-11179.

55 Además, un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a la proteína de envoltura 2 de la cepa J6CF del VHC2a, pero que no reacciona inmunológicamente con la proteína de envoltura 2 de la cepa JFH1 es un anticuerpo que reconoce la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 en el listado de secuencias como un epítipo. Un ejemplo más específico de un anticuerpo de este tipo es un anticuerpo que se produce a partir de la línea celular de hibridoma que tiene el nº de acceso FERM BP-11183. Este anticuerpo puede distinguir la cepa J6CF entre los VHC de genotipo 2a, de modo que se puede utilizar para la identificación de la cepa J6CF.

60 Además, las líneas celulares de hibridoma anteriores que tienen los nº de acceso FERM BP-11181, FERM BP-11180, FERM BP-11179, FERM BP-11183 y FERM BP-11182 se han depositado en el International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (código postal: 305-8566 central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) (fecha de depósito: 19 de septiembre de 2008) y por lo tanto están

disponibles. Cada una de estas líneas celulares se depositó originalmente en el ámbito nacional (fecha del depósito inicial: 19 de septiembre de 2008) a la misma autoridad depositaria, con los N<sup>os</sup> de acceso FERM P-21677 (n<sup>o</sup> de acceso provisional FERM AP-21677), FERM P-21676 (n<sup>o</sup> de acceso provisional FERM AP-21676), FERM P-21675 (n<sup>o</sup> de acceso provisional FERM AP-21675), FERM P-21 679 (n<sup>o</sup> de acceso provisional FERM AP-21679), y FERM P-21678 (n<sup>o</sup> de acceso provisional FERM AP-21678) y posteriormente se trasladaron al depósito internacional en el marco del el Tratado de Budapest.

Además, el método para identificar los genotipos del VHC comprende: determinar que el genotipo del VHC es genotipo 1b si el VHC se une al anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma que tiene el n<sup>o</sup> de acceso FERM BP-11181 pero no se une a ninguno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares de hibridoma que tienen los n<sup>o</sup> de acceso FERM BP-11180 y FERM BP-11179; determinar que el genotipo del VHC es genotipo 2a si el VHC se une al anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma que tiene el n<sup>o</sup> de acceso FERM BP-11181 y se une a los anticuerpos producidos por las líneas celulares de hibridoma que tienen los n<sup>o</sup> de acceso FERM BP-11180 y FERM BP-11179; y determinar que el genotipo del VHC es genotipo 1a si el VHC se une al anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma que tiene el n<sup>o</sup> de acceso FERM BP-11182, pero no se une a ninguno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares de hibridoma que tienen los n<sup>os</sup> de acceso FERM BP-11181, FERM BP-11180 y FERM BP-11179.

Si un VHC de genotipo desconocido se une o no a los anticuerpos producidos por las líneas celulares de hibridoma que tienen los n<sup>os</sup> de acceso FERM BP-11181, FERM BP-11180, FERM BP-11179 o FERM BP-11182 puede determinarse utilizando cualquier sistema de ensayo sin limitación particular, siempre y cuando sea capaz de detectar la presencia o ausencia de una reacción antígeno-anticuerpo. Un ejemplo de este método es un inmunoensayo y un método de transferencia Western que se describen a continuación.

(Inmunoensayo)

En primer lugar, una muestra de ensayo que contiene el VHC de genotipo desconocido se pone en contacto con un vehículo o una placa sobre la que el anticuerpo anterior, que va a ser examinado para detectar la presencia o ausencia de unión, se ha inmovilizado como un anticuerpo primario y posteriormente se deja reaccionar durante un tiempo suficiente para la formación de un complejo anticuerpo-antígeno en condiciones de 4°C-37°C.

A continuación, un anticuerpo secundario marcado con una enzima, un colorante, un radioisótopo o similares, que se une a VHC de una manera no específica de genotipo, se pone en contacto con el complejo anticuerpo-antígeno y posteriormente se deja reaccionar durante un tiempo suficiente para la formación de un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo secundario en condiciones de 4°C-37°C.

Por último, se detecta la presencia o ausencia del complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo secundario formado de este modo utilizando como indicador las señales de la enzima, colorante o radioisótopo utilizados para marcar el anticuerpo secundario, de manera que se puede determinar la presencia o ausencia de unión con los anticuerpos anteriores.

(Método de transferencia Western)

En primer lugar, una muestra de ensayo que contiene el VHC de genotipo desconocido se transfiere sobre una membrana, tal como una membrana de nitrocelulosa o una membrana de PVDF y posteriormente se inmovilizan las proteínas contenidas en la muestra de ensayo.

A continuación, la membrana se sumerge en leche descremada al 5%, solución de BSA al 1% o un agente de bloqueo comercial para el bloqueo, se lava suficientemente con tampón y posteriormente se transfiere a un tampón que contiene el anticuerpo anterior marcado con una enzima, un colorante, un radioisótopo o similar, para examinar la presencia o ausencia de unión. Se lleva a cabo la reacción durante un tiempo suficiente para la formación de un complejo anticuerpo-antígeno en condiciones de 4°C-37°C.

Posteriormente, la membrana se lava suficientemente y a continuación se detectan las señales procedentes de la enzima, colorante o radioisótopo utilizados para marcar el anticuerpo anterior, para el examen de la presencia o ausencia de unión, de manera que se determina la presencia o ausencia de unión con el anticuerpo anterior.

## EJEMPLOS

La presente invención se explicará más específicamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son sólo ilustrativos y el alcance de la presente invención no queda limitado por los mismos.

(Ejemplo 1) Preparación del vector para la expresión de la proteína de fusión de la proteína E2 antigénica de la cepa del VHC y la proteína de marcaje.

(1) Construcción del vector para la expresión de la proteína de fusión de la proteína E2 antigénica derivada de la cepa J6CF del VHC2a y la etiqueta 3xFLAG

Se preparó la proteína E2 antigénica derivada de la cepa J6CF del VHC2a; es decir, una proteína que comprende la región sin región transmembrana de la proteína E2 de la cepa J6CF del VHC2a, tal como se describe a continuación.

En primer lugar, un gen que codifica una proteína que comprende una región correspondiente a las posiciones de aminoácidos 384-720 de la proteína precursora (SEQ ID NO: 5) de la cepa J6CF, cuando se determinó que la metionina de iniciación en el extremo N-terminal era el 1<sup>er</sup> aminoácido, se amplificó mediante un método de PCR utilizando el ADNc del ARN genómico de la cepa J6CF del VHC2a (GenBank n° de acceso AF177036) como una plantilla, un kit de PCR Advantage GC2 (Takara Bio Inc.) y J6E2dTM-s (SEQ ID NO: 6: CACAAGCTTCGCACCCATACTGTTGGGG) y J6E2dTM-as (SEQ ID NO: 7: GCTCTAGATTACCATCGGACGATGTATTTTGT) como cebadores.

A continuación, se clonó el fragmento de ADN amplificado de este modo en pCR-TOPO (Invitrogen Corporation) y posteriormente 3 clones fueron sometidos a análisis de la secuencia. Un fragmento de gen que codifica la proteína E2 antigénica se digirió con *Hind* III y *Bam*H I y se escindió de este modo de clones que tienen el inserto de la secuencia de nucleótidos correcta. El fragmento del gen se insertó en el marco de lectura entre los sitios *Hind* III y *Bam*H I de p3xFLAG-CMV-9 (Sigma) de manera que los marcos de lectura coincidieron. Como resultado, se obtuvo un vector CMV-3xFLAGJ6E2dTM que expresa la proteína E2 antigénica a la que se había conectado la etiqueta 3xFLAG (en adelante, proteína 3xFLAG-J6E2dTM).

(2) Construcción del vector para la expresión de la proteína de fusión de la proteína E2 antigénica derivada de la cepa J6CF del VHC2a y la proteína Fc de IgG humana añadida a la proteína E2 antigénica.

En primer lugar, un gen que codifica una proteína que comprende la región correspondiente a las posiciones de aminoácidos 384 a 720 de la proteína precursora (SEQ ID NO: 5) de la cepa J6CF, cuando se determinó que la metionina de iniciación en el extremo N-terminal era el 1<sup>er</sup> aminoácido, se amplificó mediante un método de PCR utilizando el ADNc del ARN genómico de la cepa J6CF del VHC2a (GenBank n° de acceso AF177036) como una plantilla, un kit de PCR Advantage GC2 (Takara Bio Inc.) y J6E2Fc-s (SEQ ID NO: 8: CACAAGCTTCGCACCCATACTGTTGGGG) y J6E2Fc-as (SEQ ID NO: 9: ACAGGATCCCATCGGACGATGTATTTTGT) como cebadores.

A continuación, se clonó el fragmento de ADN amplificado de este modo en pCR-TOPO (Invitrogen Corporation) y posteriormente 3 clones fueron sometidos a análisis de la secuencia. Un fragmento de gen que codifica la proteína E2 antigénica se digirió con *Hind* III y *Bam*H I y se escindió de este modo de clones que tienen el inserto de la secuencia de nucleótidos correcta. Se insertó el fragmento génico entre el sitio *Hind* III y el sitio *Bam*H I secuencia abajo de la secuencia del péptido señal p3xFLAG-CMV-13 (Sigma) de manera que los marcos de lectura (marco leíble) coincidieron, es decir, se insertó en el marco de lectura. El vector resultante fue designado como CMV-13-J6E2.

Posteriormente, CMV-13-J6E2 se digirió con *Sac* I y *Bam*H I. Los fragmentos de ADN que codifican la secuencia de péptido señal y la proteína E2 antigénica, respectivamente, se separaron cada uno mediante electroforesis en gel de agarosa, y posteriormente se purificaron utilizando GeneElute (Sigma).

A continuación, los fragmentos de ADN que codifican la secuencia del péptido señal y la proteína E2 antigénica anteriores, respectivamente, se insertaron en el marco de lectura (de modo que los marcos de lectura coincidieron) entre el sitio *Sac* I y el sitio *Bam*H I del vector CDM-mIL7R-Ig (Sudo y otros, Proc Natl. Acad Sci U.S.A., 1993, Vol. 90, págs. 9.125-9.129), que expresa una proteína quimérica que comprende el receptor IL-7 de ratón-dominio Fc de inmunoglobulina humana. De este modo, se obtuvo un vector CDM-J6E2Fc que expresa la proteína E2 antigénica a la que se había conectado el dominio Fc de inmunoglobulina humana (en adelante, proteína J6E2-Fc).

(3) Construcción del vector de expresión de la proteína de fusión de la proteína antigénica E2 derivada de la cepa JFH1 del VHC2a y la proteína Fc de IgG humana

En primer lugar, un gen que codifica una proteína que comprende la región correspondiente a las posiciones de aminoácidos 384-721 de una proteína precursora de la cepa JFH1, cuando se determinó que la metionina de iniciación en el extremo N-terminal era el 1<sup>er</sup> aminoácido, se amplificó mediante un método de PCR utilizando como plantilla el ADNc del ARN genómico de la cepa JFH1 del VHC2a (GenBank n° de acceso AB047639), un kit Advantage GC2 PCR (Takara Bio Inc.), y JFE2Fc-s (SEQ ID NO: 10: CACAAGCTTGGCACCACCACCGTTGGAG) y JFE2Fc-as (SEQ ID NO: 11: ACAGGATCCTCCCATCGAACGACGTATTTTGTG) como cebadores.

A continuación, se clonó el fragmento de ADN amplificado de este modo en pCR-TOPO (Invitrogen Corporation) y posteriormente 3 clones fueron sometidos a análisis de la secuencia. Un fragmento de gen que codifica la proteína E2 antigénica se digirió con *Hind* III y *Bam*H I y se escindió de este modo de clones que tienen el inserto de

secuencia de nucleótidos correcta y posteriormente se insertó en el marco de lectura entre el sitio *Hind* III y el sitio *BamH* I secuencia abajo de una secuencia del péptido señal de p3xFLAG-CMV-13 (Sigma). El vector se designó como CMV-13-JFH1E2.

5 Posteriormente, CMV-13-JFH1E2 se digirió con *Sac* I y *BamH* I. Los fragmentos de ADN que codifican la secuencia de péptido señal y la proteína E2 antigénica, respectivamente, se separaron cada uno mediante electroforesis en gel de agarosa, y posteriormente se purificaron utilizando GeneElute (Sigma).

10 A continuación, los fragmentos de ADN que codifican la secuencia del péptido señal y la proteína E2 antigénica anteriores, respectivamente, se insertaron en el marco de lectura entre el sitio *Sac* I y el sitio *BamH* I de CDM-mIL7R-Ig. Se obtuvo de este modo un vector CDM-JFH1E2Fc que expresa la proteína E2 antigénica al que se había conectado el dominio Fc de inmunoglobulina humana (en adelante, proteína JFH1E2-Fc).

15 (4) Construcción del vector de expresión de la proteína de fusión de la proteína antigénica E2 derivada de la cepa TH del VHC1b y proteína Fc de IgG humana

20 En primer lugar, un gen que codifica una proteína que comprende la región correspondiente a las posiciones de aminoácidos 384 a 717 de una proteína precursora de la cepa TH, cuando se determinó que la metionina de iniciación en el extremo N-terminal era el 1<sup>er</sup> aminoácido, se amplificó mediante un método de PCR utilizando como plantilla el ADNc del ARN genómico de la cepa TH del VHC1b (Publicación de patente internacional WO2006/022422), un kit de PCR Advantage GC2 (Takara Bio Inc.), y THE2Fc-s (SEQ ID NO: 12: CAAAGCTTGCGACCTACGTGACGGGGGGTTCG) y THE2Fc-as (SEQ ID NO: 13: CCTCTAGATTATGGATCCCATTGATTGCATAGGAGACAACCG) como cebadores.

25 A continuación, se clonó el fragmento de ADN amplificado de este modo en pCR-TOPO (Invitrogen Corporation) y posteriormente 3 clones fueron sometidos a análisis de la secuencia. Un fragmento de gen que codifica la proteína E2 antigénica se digirió con *Hind* III y *BamH* I y se escindió de este modo de clones que tienen el inserto de secuencia de nucleótidos correcta. El fragmento del gen se insertó en el marco de lectura entre el sitio *Sac* I y el sitio *BamH* I secuencia abajo de una secuencia de péptido señal de p3xFLAG-CMV-13 (Sigma). El vector se designó CMV-13-THE2.

30 Posteriormente, CMV-13-THE2 se digirió con *Sac* I y *BamH* I. Los fragmentos de ADN que codifican la secuencia del péptido señal y la proteína E2 antigénica, respectivamente, se separaron cada uno mediante electroforesis en gel de agarosa, y posteriormente se purificaron utilizando GeneElute (Sigma).

35 A continuación, los fragmentos de ADN que codifican la secuencia del péptido señal y la proteína E2 antigénica anteriores, respectivamente, se insertaron en el marco de lectura entre el sitio *Sac* I y el sitio *BamH* I de CDM-mIL7R-Ig. De este modo, se obtuvo un vector CDM-THE2Fc que expresa la proteína E2 antigénica al que se había conectado el dominio Fc de inmunoglobulina humana (en adelante, THE2-Fc proteína).

40 (5) Construcción del vector de expresión de la proteína de fusión de la proteína antigénica E2 derivada de la cepa Con1 del VHC1b y proteína Fc de IgG humana

45 En primer lugar, un gen que codifica una proteína que comprende la región que corresponde a las posiciones de aminoácidos 384 a 716 de una proteína precursora de la cepa Con1, cuando se determinó que la metionina de iniciación en el extremo N-terminal era el 1<sup>er</sup> aminoácido, se amplificó mediante un método de PCR utilizando como plantilla ADNc del ARN genómico de la cepa Con1 del VHC1b (GenBank nº de acceso AJ238799), un kit de PCR Advantage GC2 (Takara Bio Inc.), y Con1E2Fc-s (SEQ ID NO: 14: CAAAGCTTGGAACCTATGTGACAGGGGGGACGAT) y Con1E2Fc-as (SEQ ID NO: 15: CCTCTAGATTATG GATCCCATTGATTGCAAAGGAGACAAC) como cebadores.

50 A continuación, se clonó el fragmento de ADN amplificado de este modo en pCR-TOPO (Invitrogen Corporation) y posteriormente 3 clones fueron sometidos a análisis de la secuencia. Un fragmento de gen que codifica la proteína E2 antigénica se digirió con *Hind* III y *BamH* I y se escindió de este modo de clones que tienen el inserto de secuencia de nucleótidos correcta. El fragmento del gen se insertó en el marco de lectura entre el sitio *Hind* III y el sitio *BamH* I secuencia abajo de una secuencia de péptido señal de p3xFLAG-CMV-13 (Sigma). El vector se designó CMV-13-Con1E2.

55 Posteriormente, CMV-13-Con1E2 se digirió con *Sac* I y *BamH* I. Los fragmentos de ADN que codifican la secuencia de péptido señal y la proteína E2 antigénica, respectivamente, se separaron cada uno mediante electroforesis en gel de agarosa, y posteriormente se purificaron utilizando GeneElute (Sigma).

60 Posteriormente, los fragmentos de ADN que codifican la secuencia de péptido señal y la proteína E2 antigénica, respectivamente, se insertaron en el marco de lectura entre el sitio *Sac* I y el sitio *BamH* I de CDM-mIL7R-Ig. De este modo, se obtuvo un vector CDM-Con1E2Fc que expresa la proteína E2 antigénica al que se había conectado el dominio Fc de inmunoglobulina humana (en adelante, proteína Con1E2-Fc).

65

(6) Construcción del vector de expresión de la proteína de fusión de la proteína antigénica E2 derivado de la cepa J1 del VHC1b y proteína Fc de IgG humana

5 En primer lugar, un gen que codifica una proteína que comprende la región que corresponde a las posiciones de aminoácidos 384 a 716 de una proteína precursora de la cepa J1, cuando se determinó que la metionina de iniciación en el extremo N-terminal era el 1<sup>er</sup> aminoácido, se amplificó mediante un método de PCR utilizando como plantilla el ADNc de ARN genómico derivado de la cepa J1 del VHC1b (GenBank n° de acceso D89815), un kit de PCR Advantage GC2 (Takara Bio Inc.), y J1E2Fc-s (SEQ ID NO: 16: CAAAGCTTCATACCCGCGTGACGGG  
10 GGGGGTGC) y J1E2Fc-as (SEQ ID NO: 17: CCTCTAGATTATGGATCC CACTTGATGGCAATGGAGACGACC) como cebadores.

A continuación, se clonó el fragmento de ADN amplificado de este modo en pCR-TOPO (Invitrogen Corporation) y posteriormente 3 clones fueron sometidos a análisis de la secuencia. Un fragmento de gen que codifica la proteína E2 antigénica se digirió con *Hind* III y *Bam*H I y se escindió de este modo de clones que tienen el inserto de secuencia de nucleótidos correcta. El fragmento del gen se insertó en el marco de lectura entre el sitio *Hind* III y el sitio *Bam*H I secuencia abajo de la secuencia del péptido señal p3xFLAG-CMV-13 (Sigma). El vector se designó CMV-13-J1E2.

20 Posteriormente, CMV-13-J1E2 se digirió con *Tth*111 I, se hicieron los extremos romos con ADN polimerasa T4 y, a continuación, se digirió con *Bam*H I. Los fragmentos de ADN resultantes que codifican la secuencia de péptido señal y la proteína E2 antigénica, respectivamente, se separaron cada uno mediante electroforesis en gel de agarosa, y posteriormente se purificaron utilizando GeneElute (Sigma)).

25 A continuación, se digirió CDM-mLR7R-Ig con *Bam*H I y *Xba* I para escindir un fragmento de ADN que contiene la secuencia que codifica el dominio Fc de inmunoglobulina humana. Y posteriormente, el fragmento se insertó secuencia abajo de una región promotora en pcDL-SRα296 (Takebe y otros, Proc Natl Acad Sci. U.S.A., 1,987, Vol. 84, págs. 7.388-7.392) para preparar SRαIgG1Fc. Además, los fragmentos de ADN que codifican la secuencia de péptido señal y la proteína E2 antigénica, respectivamente, se insertaron en el marco de lectura entre el sitio *Eco*R V y el sitio *Bam*H I en SRαIgG1Fc. De este modo, se obtuvo un vector SRα-J1E2Fc que expresa la proteína E2 antigénica al que se había conectado el dominio Fc de inmunoglobulina humana (en adelante, proteína J1E2-Fc).

(7) Construcción del vector de expresión de la proteína de fusión de la proteína antigénica E2 derivada de la cepa H77 del VHC1a y la proteína Fc de IgG humana

35 En primer lugar, un gen que codifica una proteína que comprende la región que corresponde a las posiciones de aminoácidos 384 a 716 de una proteína precursora de la cepa H77, cuando se determinó que la metionina de iniciación en el extremo N-terminal era el 1<sup>er</sup> aminoácido, se amplificó mediante un método de PCR utilizando como plantilla el ADNc del ARN genómico de la cepa H77 del VHC1a (GenBank n° de acceso AF011751), un kit de PCR Advantage GC2 (Takara Bio Inc.), y H77E2Fc-s (SEQ ID NO: 18: CAAAGCTTGAAACCCACGTCACCGGGGAAA)  
40 y H77E2Fc-as (SEQ ID NO: 19: CCTCTAGATTATGGATCCCA CTTAATGGCCCAGGACGCGAT) como cebadores.

A continuación, se clonó el fragmento de ADN amplificado de este modo en pCR-TOPO (Invitrogen Corporation) y posteriormente 3 clones fueron sometidos a análisis de la secuencia. Un fragmento de gen que codifica la proteína E2 antigénica se digirió con *Hind* III y *Xba* I y se escindió de este modo de clones que tienen el inserto de secuencia de nucleótidos correcta. El fragmento del gen se insertó en el marco de lectura entre el sitio *Hind* III y el sitio *Xba* I secuencia abajo de una secuencia del péptido señal de un vector p3xFLAG-CMV-13Xho, que se preparó mediante la conversión del sitio *Sac* I en el sitio *Xho* I sitio en p3xFLAG-CMV-13 (Sigma). El vector resultante se designó CMV-13-XhoH77E2.

50 Posteriormente, CMV-13-XhoH77E2 se digirió con *Xho* I y *Bam*H I y a continuación, los fragmentos de ADN que codifican la secuencia de péptido señal y la proteína E2 antigénica, respectivamente, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y después se purificaron utilizando GeneElute (Sigma).

55 A continuación, los fragmentos de ADN que codifican la secuencia de péptido señal y la proteína E2 antigénica, respectivamente, se insertaron en el marco de lectura entre el sitio *Xho* I y el sitio *Bam*H I de SRα-IgG1Fc construido en el punto 5) anterior. Se obtuvo un vector SRα-H77E2Fc que expresa la proteína E2 antigénica al que se había conectado el dominio Fc de inmunoglobulina humana (en adelante, proteína H77E2-Fc).

60 (Ejemplo 2) Expresión de la proteína de fusión de la proteína E2 antigénica y la proteína de marcaje

Se introdujeron CMV-3XFLAGJ6E2dTM, CDM-J6E2Fc, CDM-JFH1E2Fc, CDM-THE2Fc, CDM-Con1E2Fc, SRα-J1E2Fc y SRα-H77E2Fc, construidos en el ejemplo 1, en células COS1 derivadas de riñón de mono y posteriormente cada proteína de fusión se expresó tal como se describe a continuación.

65

En primer lugar, las células COS1 se subcultivaron en medio RPMI1640 (Invitrogen Corporation) que contenía suero de ternera fetal al 10% (Invitrogen Corporation), 100 U/ml de penicilina y 100 g/ml de estreptomina. En el día antes de la transferencia de genes, las células COS1 se sembraron en matraces de cultivo de 150 cm<sup>2</sup> (Corning Coaster Corporation) a una relación de división de 1:2 y posteriormente se cultivaron durante toda la noche a 37°C en un incubador a un 5% de CO<sub>2</sub>.

Posteriormente, se añadieron DEAE dextrano (GE Healthcare) y cloroquina (Sigma) al medio RPMI1640 a concentraciones finales de 400 g/ml y 100 M, respectivamente. Se añadieron 50 g del vector de expresión anterior (CMV-3xFLAGJ6E2dTM, CDM-J6E2Fc, CDM-JFH1E2Fc, CDM-THE2Fc, CDM-Con1E2Fc, SRα-J1E2Fc o SRα-H77E2Fc) a una concentración de 0,1 g/l por 13 ml y posteriormente las células se cultivaron durante 3 a 4 días.

A continuación, se retiró por aspiración el sobrenadante de las células COS1 cultivadas. Se añadieron 10 ml de PBS (-) (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), y se retiró el PBS(-) de nuevo por aspiración de las células para su lavado. Posteriormente, una mezcla de ADN-dextrano DEAE se añadió a 13 ml/matraz de 150 cm<sup>2</sup> y a continuación el producto resultante se dejó reposar a 37°C en presencia del 5% de CO<sub>2</sub>.

Cuatro horas más tarde, la mezcla de dextrano DEAE-ADN se retiró por aspiración, cada matraz se lavó una vez con 10 ml de PBS, se añadió medio de hibridoma-SFM (Invitrogen Corporation) a 50 ml/matraz, y posteriormente las células se cultivaron a 37°C en presencia del 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 días. A continuación, el sobrenadante del cultivo se recogió en un tubo de centrifuga de 50 ml (Corning Coaster Corporation) y después se centrifugó a 2.500 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 μm (Whatman).

(Ejemplo 3) Purificación de la proteína de fusión de la proteína E2 antigénica y la proteína de marcaje

El sobrenadante de cultivo de células en el que se había introducido CMV-3xFLAG-J6E2dTM se sometió a purificación utilizando agarosa anti-FLAG M2 (Sigma) tal como se describe a continuación.

En primer lugar, se añadió 1 ml de agarosa anti-FLAG M2 a 500 ml de sobrenadante de cultivo y posteriormente se dejó reaccionar a 4°C durante 2 horas con agitación en una botella giratoria. Después de 2 horas, se transfirió una mezcla del sobrenadante y agarosa anti-FLAG M2 a Econocolumn (Bio-Rad Laboratories Inc.), se retiró la fracción vacía, y posteriormente se recogió agarosa anti-FLAG M2.

A continuación, se lavó la agarosa anti-FLAG M2 dos veces con 10 ml de TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Seis fracciones (fracciones de elución de columna de anticuerpos anti-FLAG 1-6) se eluyeron con glicina-HCl 0,1 M (pH 3,5) a 1 ml/fracción. Inmediatamente después de la elución, se añadió Tris-HCl (pH 9,5) 1 M para devolver el pH a neutro. Se fraccionaron 20 l de cada fracción en condiciones reductoras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y posteriormente se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Como resultado, se confirmó que la proteína de fusión de la proteína E2 antigénica derivada de la cepa J6CF y la etiqueta 3xFLAG (proteína 3xFLAG-J6E2dTM) se había purificado (figura 4).

El sobrenadante de cultivo de células en el que se había introducido CDM-J6E2Fc, CDM-JFH1E2Fc, CDM-THE2Fc, CDM-Con1E2Fc, SRα-J1E2Fc o SRα-H77E2Fc se purificó utilizando Prosep-A (Millipore), que era un portador al que se había unido la Proteína A, tal como se describe a continuación.

En primer lugar, se llenó una Econocolumn con 1 ml de Prosep-A, se hicieron pasar 500 ml del sobrenadante del cultivo a un caudal de 1-1,5 ml/min, y después se lavó con 20 ml de PBS (-).

A continuación, se eluyeron 5 fracciones con 0,1 M glicina-HCl (pH 3,0) a 1 ml/fracción. Inmediatamente después de la elución, se añadió Tris-HCl 1 M (pH 9,5) para devolver el pH a neutro. Se fraccionaron 20 l de cada fracción en condiciones reductoras mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, y posteriormente se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Como resultado, se purificaron las proteínas de fusión de la proteína E2 antigénica derivada de cada una de las cepas del VHC y el dominio Fc de inmunoglobulina humana y se determinó que los pesos moleculares en condiciones reductoras fueron de aproximadamente 97 kDa (figura 5).

(Ejemplo 4) Inmunización de ratón con la proteína E2 antigénica de la cepa J6CF del VHC2a

Se mezclaron 0,3 ml de una solución de PBS que contenía 10 g de proteína 3xFLAG-J6E2dTM y 0,3 ml de adyuvante completo de Freund para preparar una emulsión. Un ratón Balb/c (hembra) de 7 semanas de edad se inoculó por vía subcutánea con la mitad de la cantidad de la emulsión.

Después de 2 semanas, se mezclaron 0,3 ml de una solución de PBS que contenía 10 g de proteína 3xFLAG-J6E2dTM y 0,3 ml de adyuvante incompleto de Freund para preparar una emulsión, y la mitad de la cantidad de la emulsión se administró por vía subcutánea al ratón. Después de otras 2 semanas, se administraron 0,15 ml de

solución de PBS que contenía 10 g de proteína 3xFLAG-J6E2dTM por vía intraperitoneal al ratón. Después de 3 días, se prepararon células del bazo a partir del ratón.

En otro experimento, se mezclaron 0,3 ml de solución de PBS que contenía 20 g de la proteína J6E2-Fc y 0,3 ml de alumbre (Pierce) para preparar una solución de administración. Se inoculó por vía intraperitoneal un ratón Balb/c (hembra) de 7 semanas de edad con la cantidad total de la emulsión.

De manera similar, a las 2, 4 y 6 semanas, se mezclaron 0,3 ml de solución de PBS que contenía 20 g de la proteína J6E2-Fc y 0,3 ml de alumbre para preparar una solución de administración, y la cantidad total de la emulsión se administró por vía intraperitoneal al ratón. Después de otros 2 meses, se administraron 0,3 ml de solución de PBS que contenía 20 g de la proteína J6E2-Fc por vía intraperitoneal al ratón. Después de 3 días, se prepararon células del bazo a partir del ratón.

(Ejemplo 5) Preparación de células de hibridoma

En primer lugar, la línea celular de mieloma de ratón SP2/0 (obtenido de ECACC) se cultivó en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen Corporation) que contenía 2-mercaptoetanol 55 M, 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomycin y el 10% de suero de ternera fetal (FCS; Invitrogen Corporation). De este modo, se obtuvieron células SP2/0 en la fase de crecimiento logarítmico. Las células se lavaron 3 veces con DMEM sin suero.

A continuación, se prepararon células del bazo a partir del ratón al que se había administrado la proteína 3xFLAG-J6E2dTM o la proteína J6E2-Fc y después se lavaron 3 veces con DMEM sin suero. Se añadieron células SP2/0 y células de bazo de ratón en una proporción de 1:5 en un tubo de centrifuga de 50 ml y posteriormente se sometieron a centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó completamente por aspiración. Posteriormente, el tubo de centrifuga se golpeó ligeramente para soltar los gránulos. Se añadió 1 ml de solución de polietilenglicol 1500 al 50% (Roche) precalentada a 37°C durante 1 minuto y se dejó reaccionar a 37°C durante 1 minuto.

Posteriormente, se añadió 1 ml de DMEM sin suero al tubo de centrifuga anterior durante 1 minuto, y se añadió de nuevo 1 ml de DMEM sin suero durante 1 minuto, y finalmente se añadieron 7 ml de DMEM sin suero durante 3 minutos, de modo que se diluyó una solución de etilenglicol. A continuación, el tubo de centrifuga anterior se sometió a centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos para recoger las células. Las células se suspendieron a  $1 \times 10^6$  células/ml en DMEM que contenía 2-mercaptoetanol 55 M, 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomycin, el 15% de FCS y un 10% de factor de clonación de hibridoma (BioVeris).

La suspensión de células obtenida de este modo se sembró a 100 l/pocillo en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y posteriormente se cultivaron a 37°C en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se añadieron 100 l de DMEM que contenían 2xHAT (Invitrogen Corporation), el 15% de FCS y el 10% de factor de clonación de hibridoma a cada uno de los pocillos y posteriormente las células se cultivaron continuamente a 37°C en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub>.

Después de 10 a 14 días de cultivo, se recogió el sobrenadante del cultivo en cada pocillo y, a continuación, se cribó un anticuerpo contenido en el sobrenadante de cultivo que reconoce la proteína E2 antigénica tal como se describe en el ejemplo 6.

(Ejemplo 6) Cribado de células de hibridoma productoras de anticuerpos de unión a la proteína E2 antigénica

Las células de hibridoma se cribaron inmovilizando la proteína E2 antigénica en una placa y posteriormente evaluando por EIA si los anticuerpos presentes en el sobrenadante de cultivo de células de hibridoma se habían unido a la proteína E2 antigénica inmovilizada en la placa o no.

(1) Preparación de la placa con la proteína E2 antigénica inmovilizada

La proteína 3xFLAG-J6E2dTM o la proteína J6E2-Fc se diluyeron hasta 1 g/ml con PBS y después se añadieron 50 l de cada una de las soluciones resultantes a cada pocillo de una inmunoplaaca (Nunc). La inmunoplaaca se dejó reposar a 4°C durante toda la noche, de modo que la proteína se inmovilizó sobre la placa. La solución de proteína se retiró de cada pocillo, se añadieron a cada pocillo 200 l de solución Blocking One (NACALAI TESQUE, INC.) preparada de acuerdo con los manuales incluidos, y después se llevó a cabo el bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente.

(2) Cribado de células de hibridoma

Las placas de proteína inmovilizada anteriores sometidas a bloqueo se utilizaron para el cribado del anticuerpo anti-proteína E2 en el sobrenadante de cultivo de células de hibridoma. La placa en la que se había inmovilizado la

proteína J6E2-Fc se utilizó para la detección de un anticuerpo monoclonal producido por células de hibridoma preparadas a partir del ratón al que se había administrado proteína 3xFLAG-J6E2dTM. La placa en la que se había inmovilizado la proteína 3xFLAG-J6E2dTM se utilizó para la detección de un anticuerpo monoclonal producido por células de hibridoma preparadas a partir del ratón al que se había administrado la proteína J6E2-Fc.

En concreto, las placas de proteína inmovilizada anteriores se lavaron 4 veces con PBS que contenía el 0,1% de Tween 20 (Sigma). Se añadió la muestra de sobrenadante de cada célula de hibridoma obtenida en el ejemplo 5 a 50  $\mu$ l/pocillo y posteriormente se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la compleción de la reacción, los pocillos se lavaron 4 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Se añadieron posteriormente anticuerpos anti-IgG de ratón marcados con HRP (GE Healthcare) diluidos 5.000 veces con PBS que contenía el 0,1% de Tween 20 a 50  $\mu$ l/pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la compleción de la reacción, los pocillos se lavaron 4 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%, se reveló color utilizando un kit de peroxidasa de revelado del color (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), y posteriormente se midió la absorbancia a 450 nm. De este modo, se seleccionaron clones positivos.

Como resultado, en relación con las células de hibridoma preparadas a partir del ratón al que se había administrado la proteína 3xFLAG-J6E2dTM, 11 clones se pudieron seleccionar positivamente a partir de los 980 pozos sometidos a cribado. La clonación de estos clones se llevó a cabo mediante dilución limitante, de modo que se obtuvieron las líneas de células de hibridoma 1G2-32, 2F2-7, 2F3-7, 4E8-8, 5D4-6, 9G3-2, 9A5-4, 9C4-2, 8D10-3 y 10G4-1, que tenían buenas propiedades proliferativas y productividad de anticuerpos.

Al mismo tiempo, con respecto a las células de hibridoma preparadas a partir del ratón al que se había administrado la proteína J6E2-Fc, 10 clones se pudieron seleccionar positivamente a partir de los 2.064 pocillos cribados. La clonación de estos clones se llevó a cabo mediante dilución limitante, de modo que se obtuvo una línea celular de hibridoma M1E12-1, que tenía buenas propiedades proliferativas y productividad de anticuerpos.

### (3) Análisis de isotipo y subtipo

Los isotipos y los subtipos de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma obtenidas de este modo se analizaron mediante el Kit ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping (Pierce), de acuerdo con los manuales incluidos. Como resultado, el subtipo de anticuerpo de cada clon es el que se muestra en la figura 6. Se descubrió que todos tenían cadenas ligeras de  $\kappa$ -inmunoglobulina.

### (4) Purificación del anticuerpo IgG

Las células de hibridoma obtenidas de este modo se acondicionaron finalmente para cada cultivo sin suero mediante la disminución gradual de la concentración de FCS en el medio de cultivo.

Se cultivaron cada una de las células de hibridoma hasta confluencia en medio de hibridoma SFM sin suero, (Invitrogen Corporation). La solución de cultivo se recogió en un tubo de centrifugación y después se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante del cultivo se añadió a Prosep-G (Millipore) y después se lavó con 30 volúmenes de lecho de PBS. Posteriormente, 6 fracciones se eluyeron con 1 volumen de lecho de glicina-HCl 0,1 M (pH 3,0). Inmediatamente después de la elución, se añadió Tris-HCl 1 M (pH 9,5) para devolver el pH a neutro. Se sometieron a electroforesis 20 l de cada fracción en gel de SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras y condiciones no reductoras para el fraccionamiento. La presencia o ausencia de las proteínas fue confirmada por tinción con azul brillante de Coomassie. Las fracciones de IgG se reunieron y se sometieron a continuación a diálisis contra PBS o desmineralización a través de filtración en gel, preparando de este modo las muestras de anticuerpo.

### (Ejemplo 7) Especificidad genotípica del VHC del anticuerpo monoclonal contra la proteína E2 antigénica

Se examinó si el anticuerpo monoclonal, producido por cada una de las células de hibridoma preparadas mediante la inmunización con la proteína E2 antigénica de la cepa J6CF del VHC2a, se había unido a las proteínas E2 derivadas de la cepa J6CF del genotipo 2a y la cepa JFH1 de genotipo 2a, las proteínas E2 derivadas de la cepa TH del genotipo 1b, la cepa J1 del genotipo 1b y la cepa Con1 del genotipo 1b, y una proteína E2 derivada de la cepa H77 de genotipo 1a.

Como antígenos, se utilizaron la proteína J6E2-Fc, la proteína JFH1E2-Fc, la proteína THE2-Fc, la proteína J1E2-Fc, la proteína Con1E2-Fc y la proteína H77E2-Fc preparadas en los ejemplos 1-3, que son proteínas de fusión de las proteínas E2 antigénicas y los dominios Fc de inmunoglobulina humana. Estas proteínas se inmovilizaron sobre placas y se utilizaron a continuación para su evaluación tal como se describe en el ejemplo 6.

En concreto, cada una de las proteínas de fusión anteriores se diluyó con PBS hasta 1  $\mu$ g/ml, se añadió la solución diluida a una inmunoplaaca a 50  $\mu$ l/pocillo, y posteriormente la inmunoplaaca se dejó reposar a 4°C durante toda la noche, de modo que cada proteína de fusión se inmovilizó en la placa. La solución de proteína se retiró y

posteriormente se añadió una solución Blocking One (NACALAI TESQUE, INC.) preparada de acuerdo con los manuales incluidos a 200 l/pocillo, seguido de 2 horas de bloqueo a temperatura ambiente.

5 A continuación, el anticuerpo monoclonal producido por cada célula de hibridoma se diluyó con PBS a 1 g/ml, se añadió a la placa de proteína inmovilizada anteriormente a 50 l/pocillo, y después se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la compleción de la reacción, los pocillos se lavaron 4 veces con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20, se añadió un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP diluido 5.000 veces con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20 a 50 l/pocillo y después se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la compleción de la reacción, los pocillos se lavaron 4 veces con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20, se reveló el color utilizando un kit de peroxidasa de revelado del color, y posteriormente se midió la absorbancia a 450 nm.

15 La figura 6 muestra la unión de cada anticuerpo monoclonal a las proteínas E2 antigénicas de varios genotipos o cepas del VHC. En cuanto a los valores de absorbancia, un valor de menos de 0,1 se indica con "-", un valor de 0,1 o más y menos de 0,25 se indica con "+", un valor de 0,25 o más y menos de 0,4 se indica con "++", y un valor de 0,4 o más se indica con "+++". Estos valores representan la fuerza de la unión a las proteínas E2 antigénicas. Como se muestra en la figura 6, 8D10-3 fue un anticuerpo que se unió a las proteínas E2 antigénicas de los genotipos del VHC 1a, 1b y 2a, 1G2-32 y 2F2-7 fueron anticuerpos que se unieron a las proteínas E2 antigénicas del genotipo 2a, y 4E8-8 fue un anticuerpo que se unió a las proteínas E2 antigénicas de los genotipos 1b y 2a. Además, tal como se muestra en la figura 6, M1E12-1 fue un anticuerpo que se unió a la proteína E2 antigénica de la cepa J6CF.

20 Estos resultados indican que un conjunto de los anticuerpos monoclonales anteriores se puede utilizar para identificar los genotipos del VHC o las cepas del VHC.

25 Además, una célula de hibridoma (8D10-3) que produce el anticuerpo monoclonal 8D10-3 se depositó bajo el nº de acceso FERM BP-11182, una célula de hibridoma (1G2-32) que produce el anticuerpo monoclonal 1G2-32 se depositó bajo el nº de acceso FERM BP-11179, una célula de hibridoma (2F2-7) que produce el anticuerpo monoclonal 2F2-7 se depositó bajo el nº de acceso FERM BP-11180, una célula de hibridoma (4E8-8) que produce el anticuerpo monoclonal 4E8-8 se depositó bajo el nº de acceso FERM BP-11181, y una célula de hibridoma (M1E12-1) que produce el anticuerpo monoclonal M1E12-1 se depositó bajo el nº de acceso FERM BP-11183, el 19 de septiembre de 2008, en el International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (central 6, 1-1, Higashi 1, Tsukuba, Ibaraki, Japón).

35 (Ejemplo 8) Análisis de epítipo para el anticuerpo monoclonal

Se sintetizó un grupo de péptidos (números de péptido 1-110), en los que cada péptido tenía secuencias de aminoácidos de 10 aminoácidos contiguos que fueron diseñados para ser desplazados por tres aminoácidos desde el extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos de la proteína E2 antigénica, correspondiente a las posiciones de aminoácidos 384-720 cuando la metionina de iniciación desde el extremo N-terminal de la proteína precursora de la cepa J6CF (SEQ ID NO: 5) se determinó que era el 1<sup>er</sup> aminoácido. El extremo N-terminal de cada péptido se biotiniló y se dispuso glicinamida en el extremo C-terminal del mismo (sintetizados por JPT por encargo).

45 Se disolvieron cada uno de los péptidos sintetizados de este modo en DMSO y después se disolvieron en PBS a 0,01 nmol/l. La solución de péptido se añadió a una placa recubierta con estreptavidina (Nunc) a 50 l/pocillo y posteriormente se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de péptido se descartó, se añadió una solución Blocking One (NACALAI TESQUE, INC.) preparada de acuerdo con los manuales incluidos a 200 l/pocillo, y posteriormente los pocillos se dejaron reposar a 4°C durante toda la noche, de modo que se llevó a cabo el bloqueo.

50 Posteriormente, la solución de bloqueo se desechó, los pocillos se lavaron 4 veces con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20, y posteriormente se añadió cada anticuerpo monoclonal diluido a 1 g/ml con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20 a 50 l/pocillo, seguido de 1,5 horas de reacción a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción, la solución de anticuerpo se desechó, los pocillos se lavaron 4 veces con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20, y se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con HRP (GE Healthcare) diluido 5.000 veces con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20 a 50 l/pocillo y posteriormente se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción, la solución de anticuerpo se desechó y a continuación, se lavaron los pocillos 5 veces con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20. Después del lavado, se reveló el color utilizando un kit de revelado de color de peroxidasa y posteriormente se midió la absorbancia a 450 nm, de modo que se detectó el anticuerpo que se había unido al péptido.

60 Las figuras 7A-E muestran la fuerza de unión de cada anticuerpo monoclonal a los péptidos derivados de la proteína E2 antigénica derivada de la cepa J6CF. Un valor elevado de la medición de OD 450 nm (que se muestra en los ejes longitudinales de las figuras 7A-E) indica que la fuerza de unión del anticuerpo monoclonal al péptido relevante era fuerte y que el anticuerpo reconoció específicamente el péptido. Cada anticuerpo monoclonal reconoció algunos péptidos derivados de la proteína E2 antigénica de la cepa J6CF.

65

Epítomos particularmente fuertes para el anticuerpo monoclonal 8D10-3 fueron DRLGAPTYTW (SEQ ID NO: 20; péptido nº 47), y GAPTYTWGEN (SEQ ID NO: 21; péptido nº 48) que se superponían con el epítipo del péptido (figura 7A). Basándose en los resultados, se consideró que los epítomos pueden comprender una secuencia de aminoácidos de, como mínimo, 10 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos DRLGAPTYTWGEN (SEQ ID NO: 22). YPYRLWHYPC (SEQ ID NO: 23; péptido nº 78) fue un epítipo débil (figura 7A).

Un epítipo particularmente fuerte para el anticuerpo monoclonal 4E8-8 fue WGENETDVFL (SEQ ID NO: 1; péptido nº 50). NETDVFLNS (SEQ ID NO: 24; péptido nº 51), DVFLNSTRP (SEQ ID NO: 25; péptido nº 52) y LLNSTRPPLG (SEQ ID NO: 26; péptido nº 53), que se superponían con el péptido nº 50, fueron epítomos débiles (figura 7C). Basándose en el resultado, se consideró que cada uno de los epítomos tiene una secuencia de aminoácidos de, como mínimo, 10 aminoácidos contiguos en WGENETDVFLNSTRPPLG (SEQ ID NO: 27).

Un epítipo particularmente fuerte para el anticuerpo monoclonal 2F2-7 fue GWGALQYEDN (SEQ ID NO: 2; péptido N°29) (figura 7D). FRVGWALQY (SEQ ID NO: 28; péptido nº 28), que se superponían con el péptido nº 29, fue un epítipo débil (figura 7D). Basándose en el resultado, se consideró que cada uno de los epítomos tiene una secuencia de aminoácidos de, como mínimo, 10 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos, FRVGWALQYEDN (SEQ ID NO: 29).

Epítomos particularmente fuertes para el anticuerpo monoclonal 1G2-32 fueron KTCGAPPCRT (SEQ ID NO: 3; péptido N°61) y GAPPCRTAD (SEQ ID NO: 30; péptido nº 62) (figura 7B). Basándose en el resultado, se consideró que cada uno de los epítomos tiene una secuencia de aminoácidos de, como mínimo, 10 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos, KTCGAPPCRTAD (SEQ ID NO: 31).

Epítomos particularmente fuertes para el anticuerpo monoclonal M1E12-1 fueron NYTIFKIRMY (SEQ ID NO: 4; péptido nº 82) y IFKIRMYVGG (SEQ ID NO: 32; péptido nº 83) (figura 7E). Basándose en los resultados, se consideró que cada uno de los epítomos tiene una secuencia de aminoácidos de, como mínimo, 10 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos, NYTIFKIRMYVGG (SEQ ID NO: 33).

(Ejemplo 9) Detección de la proteína de envoltura del VHC utilizando el anticuerpo monoclonal

Se examinó mediante un método ELISA sándwich y un método de transferencia Western si la proteína E2 antigénica derivada de la cepa H77 del genotipo 1a, las proteínas E2 antigénicas derivadas de la cepa J6CF del genotipo 2a y la cepa JFH1 del genotipo 2a, y las proteínas E2 antigénicas derivadas de la cepa TH del genotipo 1b, la cepa J1 del genotipo 1b y la cepa Con1 del genotipo 1b se habían detectado o no utilizando los anticuerpos monoclonales preparados a partir de las células de hibridoma preparadas anteriormente.

#### (1) ELISA Sándwich

El anticuerpo monoclonal 1G2-32 se diluyó con PBS a 1 g/ml. La solución de anticuerpo se añadió a una inmunoplaaca (Nunc) a 50 l/pocillo, y después los pocillos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 horas, de modo que el anticuerpo se inmovilizó sobre la placa. La solución de anticuerpo se eliminó, se añadió a 200 l/pocillo una solución Blocking One (NACALAI TESQUE, INC.) preparada de acuerdo con los manuales incluidos, y después los pocillos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 horas para el bloqueo.

A continuación, cada proteína de fusión de una proteína E2 antigénica y el dominio Fc de inmunoglobulina humana (es decir, la proteína JFH1E2-Fc, la proteína J6E2-Fc, la proteína THE2-Fc, la proteína Con1E2-Fc, la proteína J1E2-Fc o la proteína H77E2-Fc) se diluyó con PBS y después se añadió a la placa de proteína inmovilizada anteriormente a 50 l/pocillo, seguido de 1,5 horas de reacción a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20. Se añadió el anticuerpo monoclonal biotinilado 8D10-3 diluido a 1 g/ml con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20 a 50 l/pocillo y posteriormente se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la reacción, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20. Se añadieron 50 l de anti-estreptavidina marcada con HRP (GE Healthcare) diluida 5.000 veces con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20 y posteriormente se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1,5 horas.

Después de la reacción, los pocillos se lavaron 4 veces con PBS que contenía el 0,05% de Tween 20, el color se reveló utilizando un kit de revelado de color de peroxidasa (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), y posteriormente se midió la absorbancia a 490 nm. Los resultados se muestran en la figura 8.

La figura 8 muestra la sensibilidad de detección para las proteínas E2 antigénicas de diferentes genotipos/cepas según se determinó mediante ELISA sándwich utilizando los anticuerpos monoclonales 1G2-32 y 8D10-3. El eje horizontal indica las cantidades de las proteínas E2 antigénicas y el eje longitudinal indica absorbancias a 490 nm; es decir, las cantidades detectadas de las proteínas E2 antigénicas. El ELISA sándwich que utiliza los anticuerpos monoclonales 1G2-32 y 8D10-3 mostró que sólo las proteínas E2 antigénicas del VHC de genotipo 2a podían ser

detectadas, y que las proteínas E2 antigénicas de genotipo 1a y 1b genotipo no podían ser detectadas. Estos resultados indican que los genotipos o cepas del VHC se pueden identificar utilizando el conjunto de los anticuerpos obtenidos de acuerdo con la presente invención.

5 (2) Método de transferencia Western

10 Se añadió un quinto de volumen de una solución tampón 5x de muestra (Tris-HCl 0,3125 M, pH 6,8, 5% de SDS, 50% de glicerol, 0,05% de BPB, 5% de 2-ME) a entre 0,1 g y 0,3 g de cada proteína de fusión de una proteína E2 antigénica y el dominio Fc de inmunoglobulina humana (proteína JFH1E2-Fc, proteína J6E2-Fc, proteína THE2-Fc, proteína Con1E2-Fc, proteína J1E2-Fc o proteína H77E2-Fc), seguido de 5 minutos de tratamiento a 100°C. Los resultantes se utilizaron como muestras. Cada muestra se aplicó a gel de gradiente 4%-20% (TEFCO), se sometió a electroforesis con una corriente constante de 40 mA y posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF utilizando un aparato de transferencia semisecco a una corriente constante de 120 mA.

15 Después de la transferencia, la membrana PVDF se empapó en Block Ace (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 1 hora para el bloqueo, se lavó con TBS que contenía el 0,1% de Tween 20, se sumergió en el anticuerpo monoclonal 8D10-3 diluido con Can Get Signal (Toyobo Co., Ltd.) a 1 µg/ml, y después se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la reacción, la membrana se lavó con TBS que contenía el 0,1% de Tween 20, posteriormente se sumergió en un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP diluido 5.000 veces con Can Get Signal y posteriormente se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. La membrana se lavó con TBS que contenía el 0,1% de Tween 20 y posteriormente se detectaron las bandas utilizando un kit de ECL (GE Healthcare).

25 La figura 9 muestra la detección o la falta de detección de las proteínas E2 antigénicas de diferentes genotipos/cepas mediante un método de transferencia Western utilizando el anticuerpo monoclonal 8D10-3. Las proteínas E2 antigénicas de los 6 tipos de cepas podían ser detectadas con el anticuerpo monoclonal 8D10-3.

Aplicabilidad Industrial

30 Los anticuerpos de la presente invención hacen posible identificar de forma simple y con gran precisión los genotipos del VHC. De este modo, los efectos adversos pueden ser aliviados y se puede proporcionar la oportunidad de seleccionar nuevos métodos terapéuticos para pacientes con hepatitis C infectados con VHC de genotipo 1a o 1b, para los cuales no se hubieran esperado previamente efectos terapéuticos de la terapia con interferón.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Anticuerpo, que se une de forma específica a la proteína de envoltura 2 del virus de la hepatitis C de genotipo 2a, pero que no reacciona inmunológicamente con la proteína de envoltura 2 del virus de la hepatitis C de genotipo 1a y no reacciona inmunológicamente con la proteína de envoltura 2 del virus de la hepatitis C de genotipo 1b,
- en el que el anticuerpo reconoce la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 como un epítipo.
- 10 2. Anticuerpo, que se une de forma específica a la proteína de envoltura 2 del virus de la hepatitis C de genotipo 2a, pero que no reacciona inmunológicamente con la proteína de envoltura 2 del virus de la hepatitis C de genotipo 1a y no reacciona inmunológicamente con la proteína de envoltura 2 del virus de la hepatitis C de genotipo 1b,
- en el que el anticuerpo reconoce la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 como un epítipo.
- 15 3. Anticuerpo, según la reivindicación 1, que es producido por la línea celular de hibridoma que tiene el nº de acceso FERM BP-11180.
- 20 4. Anticuerpo, según la reivindicación 2, que es producido por la línea celular de hibridoma que tiene el nº de acceso FERM BP-11179.
5. Método para identificar el genotipo 2a del virus de la hepatitis C, en el que el genotipo del virus de la hepatitis C se determina que es 2a si el virus se une al anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma que tiene el nº de acceso FERM BP-11181 y se une a los anticuerpos, según las reivindicaciones 3 y 4.

Fig. 1

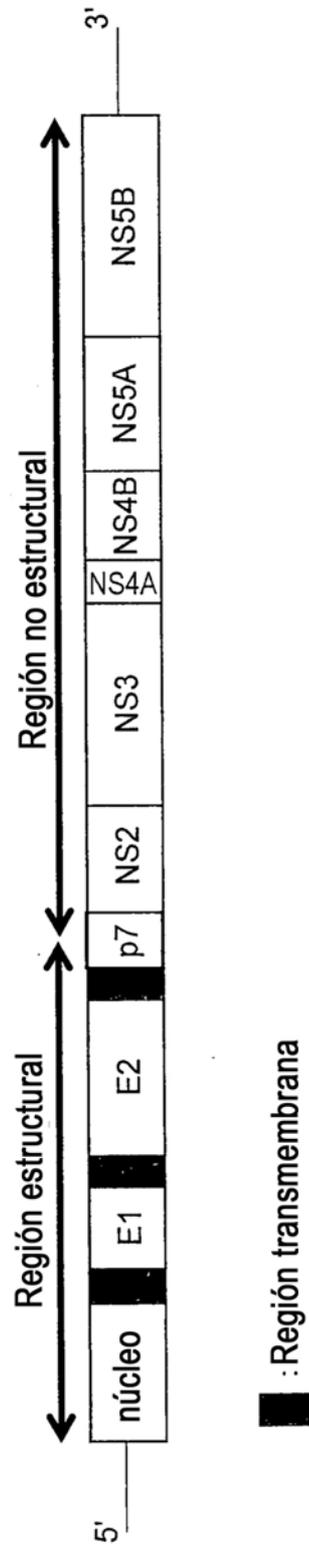


Fig. 2

Proteína 3XFLAG

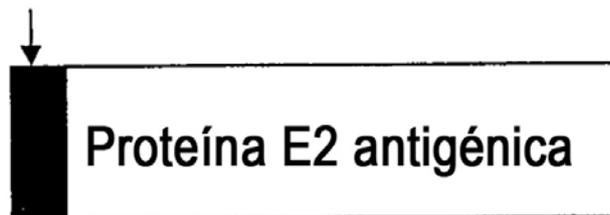


Fig. 3

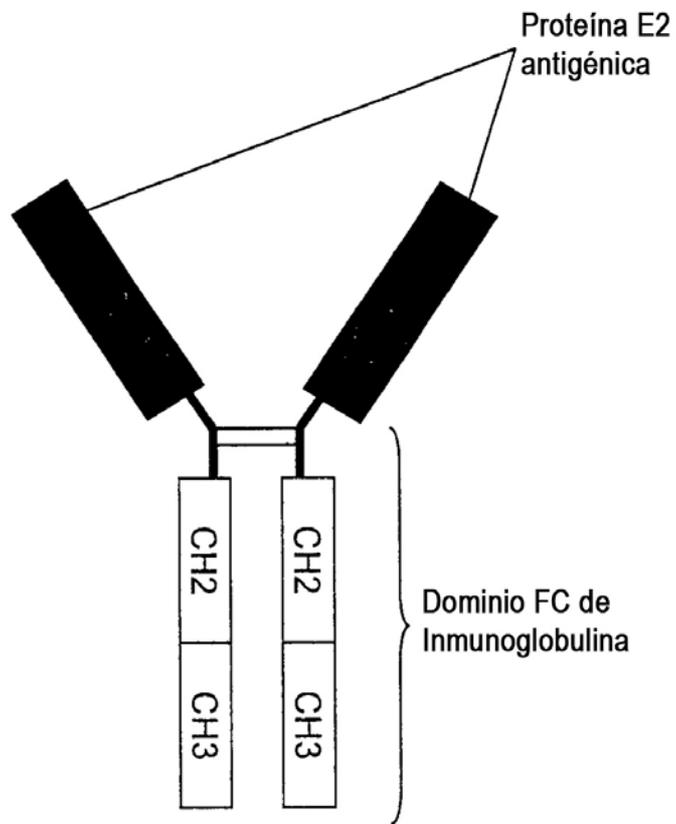
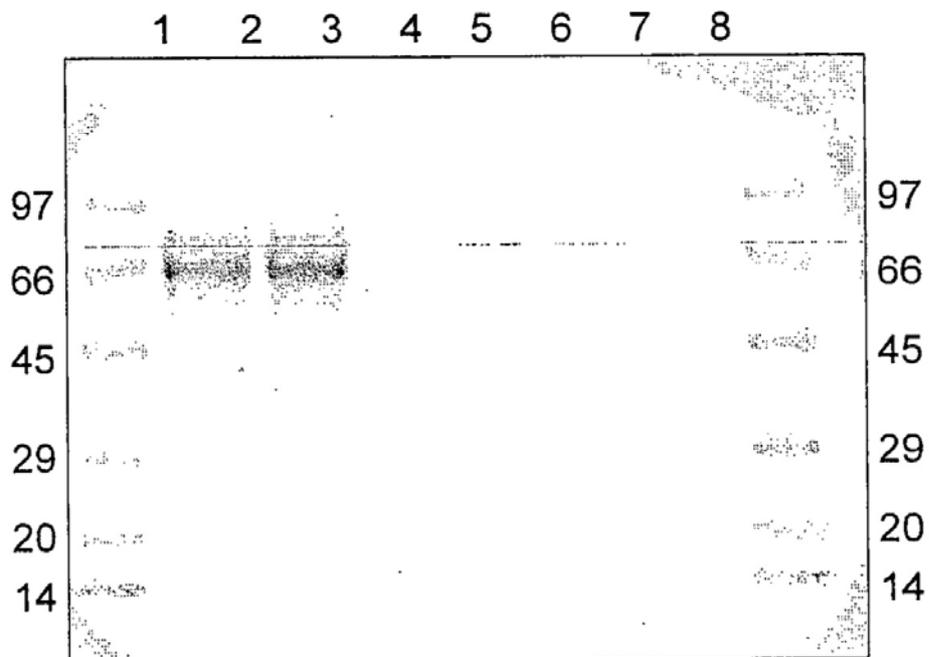
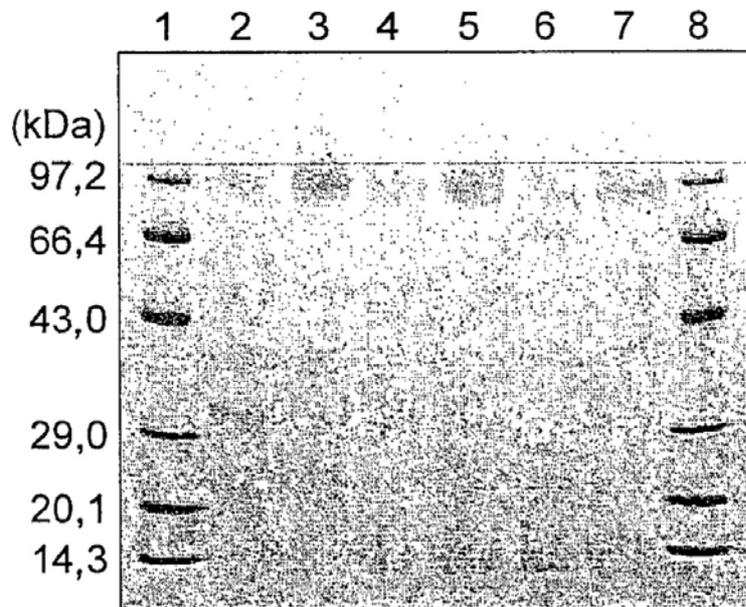


Fig. 4



1. Marcador de peso molecular
2. Sobrenante del cultivo
3. Fracción vacía de columna de anticuerpo anti-FLAG
4. Fracción de elución 1 de columna de anticuerpo anti-FLAG
5. Fracción de elución 2 de columna de anticuerpo anti-FLAG
6. Fracción de elución 3 de columna de anticuerpo anti-FLAG
7. Fracción de elución 4 de columna de anticuerpo anti-FLAG
8. Marcador de peso molecular

Fig. 5



1. Marcador de peso molecular
2. J6E2-Fc
3. JFH1E2-Fc
4. THE2-Fc
5. Con1E2-Fc
6. J1E2-Fc
7. H77E2-Fc
8. Marcador de peso molecular

Fig. 6

Nombre del clon	Cepa de VCH		VCH 2a		VCH 1b			VCH 1a	Subtipo de anticuerpo
	J6	JFH1	TH	Con1	J1	H77			
2F3-7	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	IgG1/κ	
4E8-8	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	IgG1/κ	
5D4-6	+++	+++	+++	+	+++	-	-	IgG1/κ	
9G3-2	+++	+++	-	+++	+++	-	-	IgG1/κ	
9A5-4	+++	-	-	-	-	+++	+++	IgG2b/κ	
9C4-2	+++	+++	-	+	-	-	-	IgG2a/κ	
10G4-1	+++	+++	-	+++	+++	-	-	IgG1/κ	
2F2-7	++	+++	-	-	-	-	-	IgG1/κ	
1G2-32	+++	+++	-	-	-	-	-	IgG2a/κ	
8D10-3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	IgG1/κ	
M1E12-1	++	-	-	-	-	-	-	IgG1/κ	

OD450nm < 0,1 -  
 0,1 ≤ OD450nm < 0,25 +  
 0,25 ≤ OD450nm < 0,4 ++  
 0,4 ≤ OD450nm +++

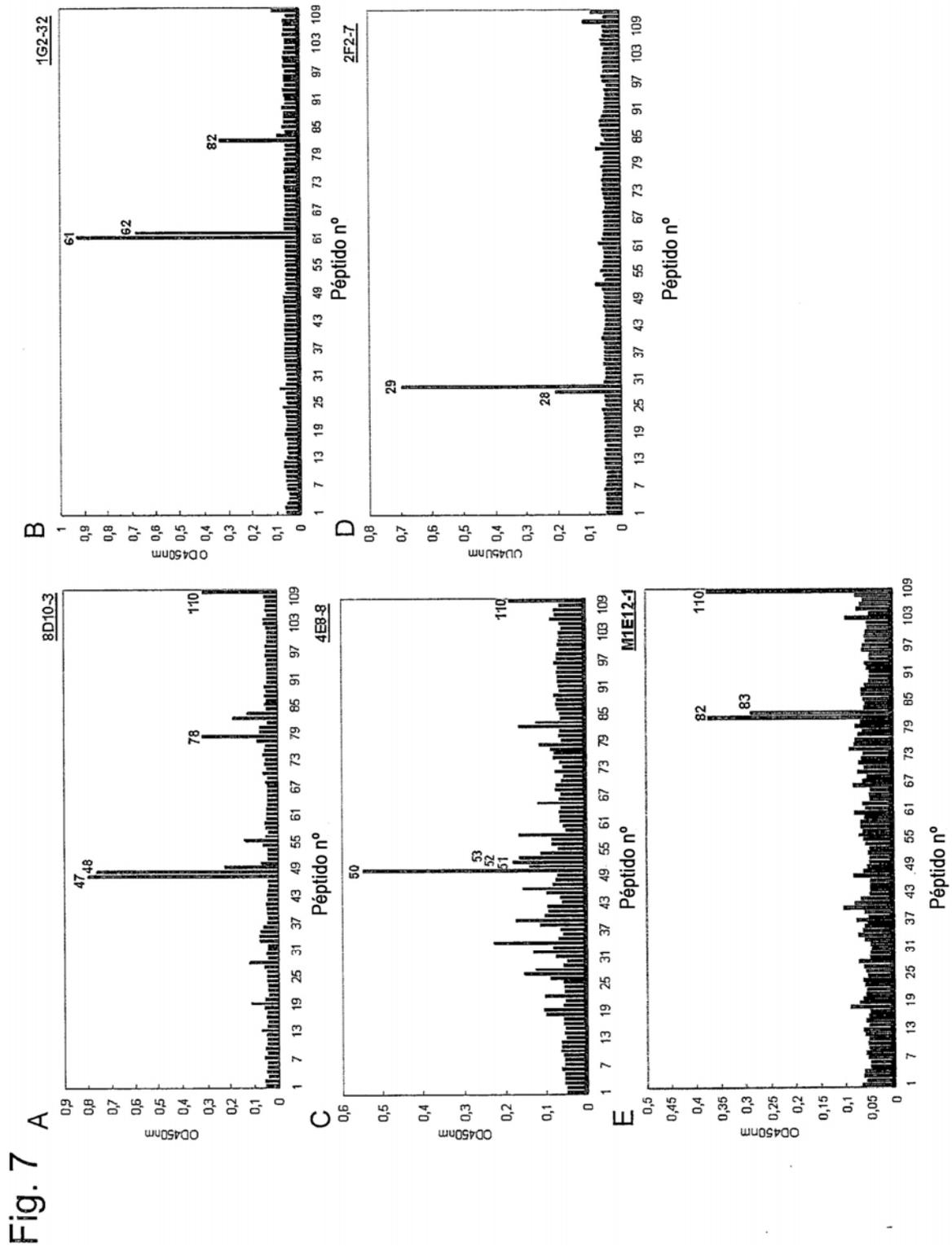


Fig. 8

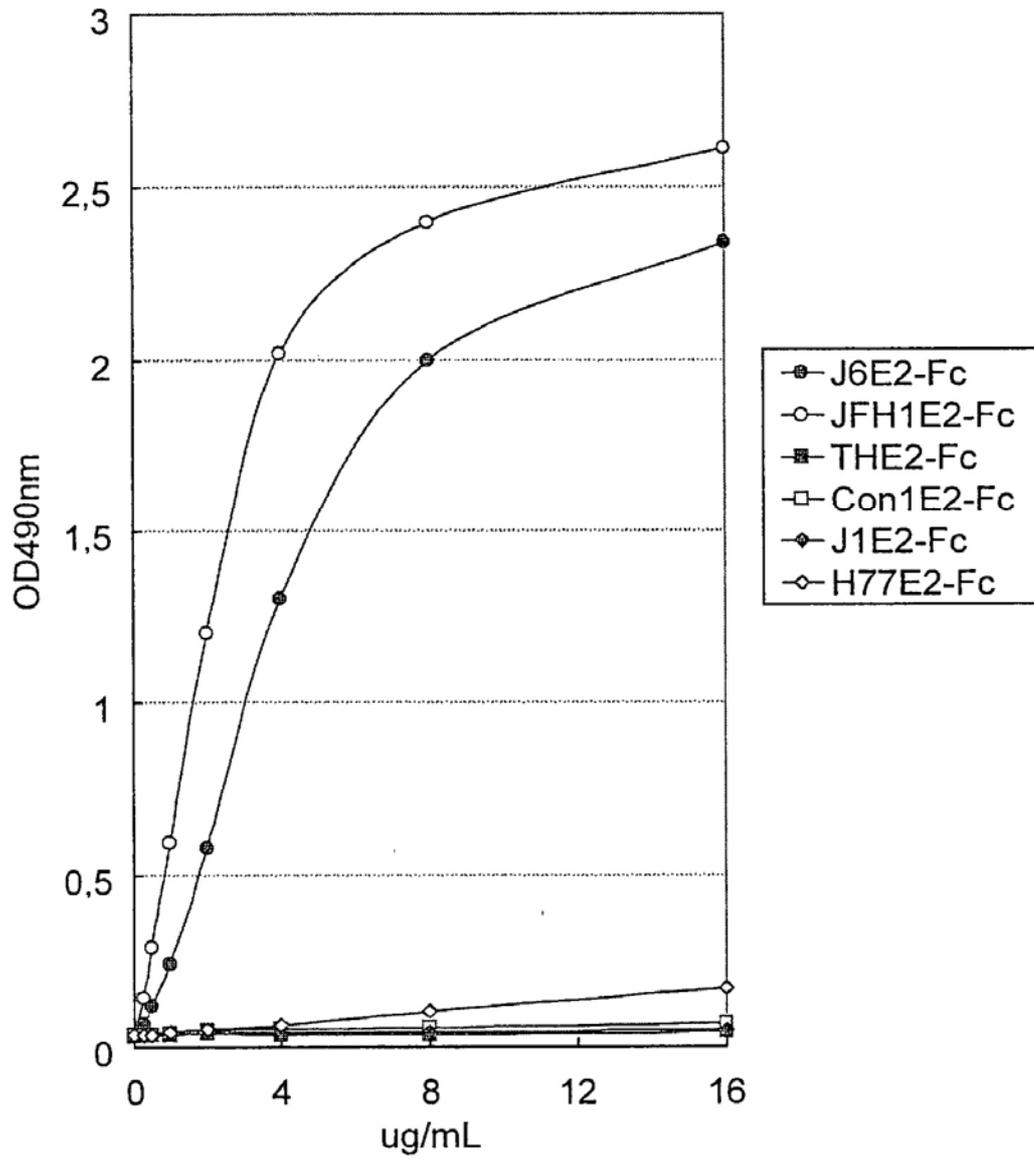
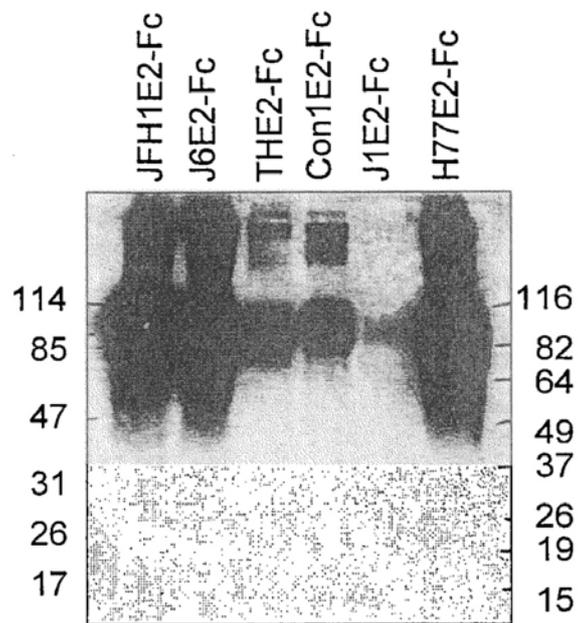


Fig. 9



LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> **Toray Industries, Inc.**  
 Japón representado por el director general del National Institute of Infectious Diseases
- <120> Anticuerpo que se une a la proteína de envoltura 2 del virus de la hepatitis C y método para identificar el genotipo del virus de la hepatitis C utilizando el mismo
- <130> **PH-4140-PCT**
- <140> **PCT/JP2009/067051**  
 <141> **2009-09-30**
- <150> **JP 2008-254338**  
 <151> **2008-09-30**
- <160> **33**
- <170> **Patente Internacional versión 3.1**
- <210> **1**  
 <211> **10**  
 <212> **PRT**  
 <213> **Virus de la hepatitis C**
- <400> **1**
- Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Phe Leu**  
**1 5 10**
- <210> **2**  
 <211> **10**  
 <212> **PRT**  
 <213> **Virus de la hepatitis C**
- <400> **2**
- Gly Trp Gly Ala Leu Gln Tyr Glu Asp Asn**  
**1 5 10**
- <210> **3**  
 <211> **10**  
 <212> **PRT**  
 <213> **Virus de la hepatitis C**
- <400> **3**
- Lys Thr Cys Gly Ala Pro Pro Cys Arg Thr**  
**1 5 10**
- <210> **4**  
 <211> **10**  
 <212> **PRT**  
 <213> **Virus de la hepatitis C**
- <400> **4**
- Asn Tyr Thr Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr**  
**1 5 10**

ES 2 564 586 T3

<210> 5  
 <211> 3033  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis C  
  
 <400> 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 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 Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly  
 65 70 75 80  
  
 Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp  
 85 90 95  
  
 Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Asn Asp Pro  
 100 105 110  
  
 Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys  
 115 120 125  
  
 Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Val Val Gly Ala Pro Leu  
 130 135 140  
  
 Gly Gly Val Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp  
 145 150 155 160  
  
 Gly Val Asn Phe Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile  
 165 170 175  
  
 Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Ile Thr Thr Pro Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
  
 Glu Val Lys Asn Ile Ser Thr Gly Tyr Met Val Thr Asn Asp Cys Thr  
 195 200 205  
  
 Asn Asp Ser Ile Thr Trp Gln Leu Gln Ala Ala Val Leu His Val Pro  
 210 215 220

ES 2 564 586 T3

Gly Cys Val Pro Cys Glu Lys Val Gly Asn Ala Ser Gln Cys Trp Ile  
 225 230 235 240

Pro Val Ser Pro Asn Val Ala Val Gln Arg Pro Gly Ala Leu Thr Gln  
 245 250 255

Gly Leu Arg Thr His Ile Asp Met Val Val Met Ser Ala Thr Leu Cys  
 260 265 270

Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Gly Val Met Leu Ala Ala  
 275 280 285

Gln Met Phe Ile Val Ser Pro Gln His His Trp Phe Val Gln Asp Cys  
 290 295 300

Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly Thr Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp  
 305 310 315 320

Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Thr Met Ile Leu Ala Tyr  
 325 330 335

Ala Met Arg Val Pro Glu Val Ile Ile Asp Ile Ile Ser Gly Ala His  
 340 345 350

Trp Gly Val Met Phe Gly Leu Ala Tyr Phe Ser Met Gln Gly Ala Trp  
 355 360 365

Ala Lys Val Val Val Ile Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Asp Ala Arg  
 370 375 380

Thr His Thr Val Gly Gly Ser Ala Ala Gln Thr Thr Gly Arg Leu Thr  
 385 390 395 400

Ser Leu Phe Asp Met Gly Pro Arg Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr  
 405 410 415

Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser  
 420 425 430

Leu His Thr Gly Phe Ile Ala Ser Leu Phe Tyr Thr His Ser Phe Asn  
 435 440 445

Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ser Ala Cys Arg Ser Ile Glu Ala  
 450 455 460

Phe Arg Val Gly Trp Gly Ala Leu Gln Tyr Glu Asp Asn Val Thr Asn



ES 2 564 586 T3

Glu Trp Val Ile Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys  
 725 730 735  
 Ala Cys Leu Trp Met Leu Ile Leu Leu Gly Gln Ala Glu Ala Ala Leu  
 740 745 750  
 Glu Lys Leu Val Ile Leu His Ala Ala Ser Ala Ala Ser Cys Asn Gly  
 755 760 765  
 Phe Leu Tyr Phe Val Ile Phe Phe Val Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly  
 770 775 780  
 Arg Val Val Pro Leu Ala Thr Tyr Ser Leu Thr Gly Leu Trp Ser Phe  
 785 790 795 800  
 Ser Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gln Gln Ala Tyr Ala Tyr Asp Ala  
 805 810 815  
 Ser Val His Gly Gln Ile Gly Ala Ala Leu Leu Val Met Ile Thr Leu  
 820 825 830  
 Phe Thr Leu Thr Pro Gly Tyr Lys Thr Leu Leu Ser Arg Phe Leu Trp  
 835 840 845  
 Trp Leu Cys Tyr Leu Leu Thr Leu Gly Glu Ala Met Val Gln Glu Trp  
 850 855 860  
 Ala Pro Pro Met Gln Val Arg Gly Gly Arg Asp Gly Ile Ile Trp Ala  
 865 870 875 880  
 Val Ala Ile Phe Tyr Pro Gly Val Val Phe Asp Ile Thr Lys Trp Leu  
 885 890 895  
 Leu Ala Val Leu Gly Pro Ala Tyr Leu Leu Lys Gly Ala Leu Thr Arg  
 900 905 910  
 Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala His Ala Leu Leu Arg Met Cys Thr Met  
 915 920 925  
 Ala Arg His Leu Ala Gly Gly Arg Tyr Val Gln Met Ala Leu Leu Ala  
 930 935 940  
 Leu Gly Arg Trp Thr Gly Thr Tyr Ile Tyr Asp His Leu Thr Pro Met  
 945 950 955 960  
 Ser Asp Trp Ala Ala Ser Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu  
 965 970 975

ES 2 564 586 T3

Pro Ile Ile Phe Ser Pro Met Glu Lys Lys Val Ile Val Trp Gly Ala  
 980 985 990

Glu Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Leu His Gly Leu Pro Val Ser Ala  
 995 1000 1005

Arg Leu Gly Arg Glu Val Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Tyr Thr  
 1010 1015 1020

Ser Lys Gly Trp Ser Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln  
 1025 1030 1035

Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Thr Ile Val Val Ser Met Thr Gly  
 1040 1045 1050

Arg Asp Lys Thr Glu Gln Ala Gly Glu Ile Gln Val Leu Ser Thr  
 1055 1060 1065

Val Thr Gln Ser Phe Leu Gly Thr Ser Ile Ser Gly Val Leu Trp  
 1070 1075 1080

Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Asn Lys Thr Leu Ala Gly Ser Arg  
 1085 1090 1095

Gly Pro Val Thr Gln Met Tyr Ser Ser Ala Glu Gly Asp Leu Val  
 1100 1105 1110

Gly Trp Pro Ser Pro Pro Gly Thr Lys Ser Leu Glu Pro Cys Thr  
 1115 1120 1125

Cys Gly Ala Val Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg Asn Ala Asp Val  
 1130 1135 1140

Ile Pro Ala Arg Arg Arg Gly Asp Lys Arg Gly Ala Leu Leu Ser  
 1145 1150 1155

Pro Arg Pro Leu Ser Thr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Val  
 1160 1165 1170

Leu Cys Pro Arg Gly His Ala Val Gly Val Phe Arg Ala Ala Val  
 1175 1180 1185

Cys Ser Arg Gly Val Ala Lys Ser Ile Asp Phe Ile Pro Val Glu  
 1190 1195 1200

Thr Leu Asp Ile Val Thr Arg Ser Pro Thr Phe Ser Asp Asn Ser  
 1205 1210 1215

ES 2 564 586 T3

Thr Pro Pro Ala Val Pro Gln Thr Tyr Gln Val Gly Tyr Leu His  
 1220 1225 1230  
 Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Val Ala Tyr  
 1235 1240 1245  
 Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala  
 1250 1255 1260  
 Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Leu Ser Lys Ala His Gly Ile  
 1265 1270 1275  
 Asn Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Val Thr Thr Gly Ala  
 1280 1285 1290  
 Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly  
 1295 1300 1305  
 Cys Ala Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His  
 1310 1315 1320  
 Ala Val Asp Ser Thr Thr Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp  
 1325 1330 1335  
 Gln Ala Glu Thr Ala Gly Val Arg Leu Thr Val Leu Ala Thr Ala  
 1340 1345 1350  
 Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Thr Pro His Pro Asn Ile Glu Glu  
 1355 1360 1365  
 Val Ala Leu Gly Gln Glu Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Arg Ala  
 1370 1375 1380  
 Ile Pro Leu Ser Tyr Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys  
 1385 1390 1395  
 His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Ala Leu Arg Gly  
 1400 1405 1410  
 Met Gly Leu Asn Ser Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser  
 1415 1420 1425  
 Val Ile Pro Thr Gln Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala  
 1430 1435 1440  
 Leu Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys

ES 2 564 586 T3

1445						1450									1455
Asn	Val	Ala	Val	Thr	Gln	Val	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp	Pro	Thr	
1460						1465					1470				
Phe	Thr	Ile	Thr	Thr	Gln	Ile	Val	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	
1475						1480					1485				
Ser	Gln	Arg	Arg	Gly	Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Arg	Leu	Gly	Ile	Tyr	
1490						1495					1500				
Arg	Tyr	Val	Ser	Thr	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Gly	Met	Phe	Asp	Ser	
1505						1510					1515				
Val	Val	Leu	Cys	Glu	Cys	Tyr	Asp	Ala	Gly	Ala	Ala	Trp	Tyr	Glu	
1520						1525					1530				
Leu	Thr	Pro	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Arg	Leu	Arg	Ala	Tyr	Phe	Asn	
1535						1540					1545				
Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Cys	Gln	Asp	His	Leu	Glu	Phe	Trp	Glu	
1550						1555					1560				
Ala	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp	Ala	His	Phe	Leu	Ser	
1565						1570					1575				
Gln	Thr	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu	Asn	Phe	Ala	Tyr	Leu	Thr	Ala	Tyr	
1580						1585					1590				
Gln	Ala	Thr	Val	Cys	Ala	Arg	Ala	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Trp	
1595						1600					1605				
Asp	Val	Met	Trp	Lys	Cys	Leu	Thr	Arg	Leu	Lys	Pro	Thr	Leu	Val	
1610						1615					1620				
Gly	Pro	Thr	Pro	Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ser	Val	Thr	Asn	Glu	
1625						1630					1635				
Val	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Val	Thr	Lys	Tyr	Ile	Ala	Thr	Cys	Met	
1640						1645					1650				
Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Met	Thr	Ser	Thr	Trp	Val	Leu	Ala	Gly	
1655						1660					1665				
Gly	Val	Leu	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Tyr	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Cys	
1670						1675					1680				

ES 2 564 586 T3

Val Cys Ile Ile Gly Arg Leu His Ile Asn Gln Arg Ala Val Val  
 1685 1690 1695

Ala Pro Asp Lys Glu Val Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu Met Glu  
 1700 1705 1710

Glu Cys Ala Ser Arg Ala Ala Leu Ile Glu Glu Gly Gln Arg Ile  
 1715 1720 1725

Ala Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly Leu Leu Gln Gln Ala  
 1730 1735 1740

Ser Lys Gln Ala Gln Asp Ile Gln Pro Thr Val Gln Ala Ser Trp  
 1745 1750 1755

Pro Lys Val Glu Gln Phe Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile  
 1760 1765 1770

Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn  
 1775 1780 1785

Pro Ala Val Ala Ser Met Met Ala Phe Ser Ala Ala Leu Thr Ser  
 1790 1795 1800

Pro Leu Ser Thr Ser Thr Thr Ile Leu Leu Asn Ile Leu Gly Gly  
 1805 1810 1815

Trp Leu Ala Ser Gln Ile Ala Pro Pro Ala Gly Ala Thr Gly Phe  
 1820 1825 1830

Val Val Ser Gly Leu Val Gly Ala Ala Val Gly Ser Ile Gly Leu  
 1835 1840 1845

Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Ile  
 1850 1855 1860

Ser Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Glu Lys Pro  
 1865 1870 1875

Ser Met Glu Asp Val Val Asn Leu Leu Pro Gly Ile Leu Ser Pro  
 1880 1885 1890

Gly Ala Leu Val Val Gly Val Ile Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg  
 1895 1900 1905

His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu  
 1910 1915 1920

ES 2 564 586 T3

Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ala Pro Thr His Tyr  
 1925 1930 1935

Val Thr Glu Ser Asp Ala Ser Gln Arg Val Thr Gln Leu Leu Gly  
 1940 1945 1950

Ser Leu Thr Ile Thr Ser Leu Leu Arg Arg Leu His Asn Trp Ile  
 1955 1960 1965

Thr Glu Asp Cys Pro Ile Pro Cys Gly Gly Ser Trp Leu Arg Asp  
 1970 1975 1980

Val Trp Asp Trp Val Cys Thr Ile Leu Thr Asp Phe Lys Asn Trp  
 1985 1990 1995

Leu Thr Ser Lys Leu Phe Pro Lys Met Pro Gly Leu Pro Phe Val  
 2000 2005 2010

Ser Cys Gln Lys Gly Tyr Lys Gly Val Trp Ala Gly Thr Gly Ile  
 2015 2020 2025

Met Thr Thr Arg Cys Pro Cys Gly Ala Asn Ile Ser Gly Asn Val  
 2030 2035 2040

Arg Leu Gly Ser Met Arg Ile Thr Gly Pro Lys Thr Cys Met Asn  
 2045 2050 2055

Ile Trp Gln Gly Thr Phe Pro Ile Asn Cys Tyr Thr Glu Gly Gln  
 2060 2065 2070

Cys Val Pro Lys Pro Ala Pro Asn Phe Lys Val Ala Ile Trp Arg  
 2075 2080 2085

Val Ala Ala Ser Glu Tyr Ala Glu Val Thr Gln His Gly Ser Tyr  
 2090 2095 2100

His Tyr Ile Thr Gly Leu Thr Thr Asp Asn Leu Lys Val Pro Cys  
 2105 2110 2115

Gln Leu Pro Ser Pro Glu Phe Phe Ser Trp Val Asp Gly Val Gln  
 2120 2125 2130

Ile His Arg Phe Ala Pro Thr Pro Lys Pro Phe Phe Arg Asp Glu  
 2135 2140 2145

Val Ser Phe Cys Val Gly Leu Asn Ser Phe Val Val Gly Ser Gln  
 2150 2155 2160

ES 2 564 586 T3

Leu Pro Cys Asp Pro Glu Pro Asp Thr Asp Val Leu Met Ser Met  
 2165 2170 2175  
  
 Leu Thr Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Ala Arg Arg  
 2180 2185 2190  
  
 Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Glu Ala Ser Ser Ser Ala Ser  
 2195 2200 2205  
  
 Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Arg Ala Thr Cys Thr Thr His Gly  
 2210 2215 2220  
  
 Lys Ala Tyr Asp Val Asp Met Val Asp Ala Asn Leu Phe Met Gly  
 2225 2230 2235  
  
 Gly Asp Val Thr Arg Ile Glu Ser Gly Ser Lys Val Val Val Leu  
 2240 2245 2250  
  
 Asp Ser Leu Asp Pro Met Val Glu Glu Arg Ser Asp Leu Glu Pro  
 2255 2260 2265  
  
 Ser Ile Pro Ser Glu Tyr Met Leu Pro Lys Lys Arg Phe Pro Pro  
 2270 2275 2280  
  
 Ala Leu Pro Ala Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val  
 2285 2290 2295  
  
 Glu Ser Trp Lys Arg Pro Asp Tyr Gln Pro Ala Thr Val Ala Gly  
 2300 2305 2310  
  
 Cys Ala Leu Pro Pro Pro Arg Lys Thr Pro Thr Pro Pro Pro Arg  
 2315 2320 2325  
  
 Arg Arg Arg Thr Val Gly Leu Ser Glu Asp Ser Ile Gly Asp Ala  
 2330 2335 2340  
  
 Leu Gln Gln Leu Ala Ile Lys Ser Phe Gly Gln Pro Pro Pro Ser  
 2345 2350 2355  
  
 Gly Asp Ser Gly Leu Ser Thr Gly Ala Gly Ala Ala Asp Ser Gly  
 2360 2365 2370  
  
 Ser Gln Thr Pro Pro Asp Glu Leu Ala Leu Ser Glu Thr Gly Ser  
 2375 2380 2385  
  
 Ile Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Leu Gly Asp Pro Asp

ES 2 564 586 T3

2390						2395								2400
Leu	Glu	Pro	Glu	Gln	Val	Glu	Pro	Gln	Pro	Pro	Pro	Gln	Gly	Gly
2405						2410								2415
Val	Ala	Ala	Pro	Gly	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Trp	Ser	Thr	Cys	Ser
2420						2425								2430
Glu	Glu	Asp	Asp	Ser	Val	Val	Cys	Cys	Ser	Met	Ser	Tyr	Ser	Trp
2435						2440								2445
Thr	Gly	Ala	Leu	Ile	Thr	Pro	Cys	Ser	Pro	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu
2450						2455								2460
Pro	Ile	Asn	Pro	Leu	Ser	Asn	Ser	Leu	Leu	Arg	Tyr	His	Asn	Lys
2465						2470								2475
Val	Tyr	Cys	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Ser	Leu	Arg	Ala	Lys	Lys
2480						2485								2490
Val	Thr	Phe	Asp	Arg	Met	Gln	Val	Leu	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Ser
2495						2500								2505
Val	Leu	Lys	Asp	Ile	Lys	Leu	Ala	Ala	Ser	Lys	Val	Thr	Ala	Arg
2510						2515								2520
Leu	Leu	Thr	Met	Glu	Glu	Ala	Cys	Gln	Leu	Thr	Pro	Pro	His	Ser
2525						2530								2535
Ala	Arg	Ser	Lys	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ala	Lys	Glu	Val	Arg	Ser	Leu
2540						2545								2550
Ser	Gly	Arg	Ala	Val	Asn	His	Ile	Lys	Ser	Val	Trp	Lys	Asp	Leu
2555						2560								2565
Leu	Glu	Asp	Ser	Glu	Thr	Pro	Ile	Pro	Thr	Thr	Ile	Met	Ala	Lys
2570						2575								2580
Asn	Glu	Val	Phe	Cys	Val	Asp	Pro	Thr	Lys	Gly	Gly	Lys	Lys	Ala
2585						2590								2595
Ala	Arg	Leu	Ile	Val	Tyr	Pro	Asp	Leu	Gly	Val	Arg	Val	Cys	Glu
2600						2605								2610
Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asp	Ile	Thr	Gln	Lys	Leu	Pro	Gln	Ala	Val
2615						2620								2625

ES 2 564 586 T3

Met Gly Ala Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Ala Gln Arg Val  
 2630 2635 2640

Glu Phe Leu Leu Lys Ala Trp Ala Glu Lys Lys Asp Pro Met Gly  
 2645 2650 2655

Phe Ser Tyr Asp Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Arg  
 2660 2665 2670

Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ser Ile Tyr Arg Ala Cys Ser Leu Pro  
 2675 2680 2685

Glu Glu Ala His Thr Ala Ile His Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr  
 2690 2695 2700

Val Gly Gly Pro Met Phe Asn Ser Lys Gly Gln Thr Cys Gly Tyr  
 2705 2710 2715

Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Ser Met Gly Asn  
 2720 2725 2730

Thr Ile Thr Cys Tyr Val Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Ala Ala  
 2735 2740 2745

Gly Ile Ile Ala Pro Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu Val  
 2750 2755 2760

Val Ile Ser Glu Ser Gln Gly Thr Glu Glu Asp Glu Arg Asn Leu  
 2765 2770 2775

Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly  
 2780 2785 2790

Asp Pro Pro Arg Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys  
 2795 2800 2805

Ser Ser Asn Val Ser Val Ala Leu Gly Pro Gln Gly Arg Arg Arg  
 2810 2815 2820

Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Ile Ala Arg Ala Ala  
 2825 2830 2835

Trp Glu Thr Val Arg His Ser Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn  
 2840 2845 2850

Ile Ile Gln Tyr Ala Pro Thr Ile Trp Ala Arg Met Val Leu Met  
 2855 2860 2865

ES 2 564 586 T3

Thr His Phe Phe Ser Ile Leu Met Ala Gln Asp Thr Leu Asp Gln  
 2870 2875 2880

Asn Leu Asn Phe Glu Met Tyr Gly Ala Val Tyr Ser Val Ser Pro  
 2885 2890 2895

Leu Asp Leu Pro Ala Ile Ile Glu Arg Leu His Gly Leu Asp Ala  
 2900 2905 2910

Phe Ser Leu His Thr Tyr Thr Pro His Glu Leu Thr Arg Val Ala  
 2915 2920 2925

Ser Ala Leu Arg Lys Leu Gly Ala Pro Pro Leu Arg Ala Trp Lys  
 2930 2935 2940

Ser Arg Ala Arg Ala Val Arg Ala Ser Leu Ile Ser Arg Gly Gly  
 2945 2950 2955

Arg Ala Ala Val Cys Gly Arg Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val Lys  
 2960 2965 2970

Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Leu Pro Glu Ala Arg Leu Leu Asp  
 2975 2980 2985

Leu Ser Ser Trp Phe Thr Val Gly Ala Gly Gly Gly Asp Ile Tyr  
 2990 2995 3000

His Ser Val Ser Arg Ala Arg Pro Arg Leu Leu Leu Phe Gly Leu  
 3005 3010 3015

Leu Leu Leu Phe Val Gly Val Gly Leu Phe Leu Leu Pro Ala Arg  
 3020 3025 3030

<210> 6  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 6  
 cacaagcttc gcaccatac tggtggg

<210> 7  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 7  
gctctagatt accatcggac gatgtatddd gt 32

<210> 8  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador

<400> 8  
cacaagcttc gcaccatac tgttgagg 28

<210> 9  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador

<400> 9  
acaggatccc atcggacgat gtatdddgtg 30

<210> 10  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador

<400> 10  
cacaagcttg gcaccaccac cgttgagg 28

<210> 11  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador

<400> 11  
acaggatcct cccatcgaac gacgtatddd gtg 33

<210> 12  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador

<400> 12

caaagcttgc gacctacgtg acgggggggt cg 32

<210> 13  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 13  
 cctctagatt atggatccca tttgattgca taggagacaa ccg 43

<210> 14  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 14  
 caaagcttgg aacctatgtg acagggggga cgat 34

<210> 15  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 15  
 cctctagatt atggatccca tttgattgca aaggagacaa c 41

<210> 16  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 16  
 caaagcttca taccgcggtg acgggggggg tgc 33

<210> 17  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 17  
 cctctagatt atggatccca cttgatggca atggagacga cc 42

ES 2 564 586 T3

<210> 18  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 18  
 caaagcttga aaccacgtc accgggggaa a

31

<210> 19  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 19  
 cctctagatt atggatccca cttaatggcc caggacgcga t

41

<210> 20  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 20

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

<210> 21  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 21

Gly Ala Pro Thr Tyr Thr Trp Gly Glu Asn  
 1 5 10

<210> 22  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 22

Asp Arg Leu Gly Ala Pro Thr Tyr Thr Trp Gly Glu Asn  
 1 5 10

<210> 23  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 23

Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys  
1 5 10

<210> 24  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis C  
  
<400> 24

Asn Glu Thr Asp Val Phe Leu Leu Asn Ser  
1 5 10

<210> 25  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis C  
  
<400> 25

Asp Val Phe Leu Leu Asn Ser Thr Arg Pro  
1 5 10

<210> 26  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis C  
  
<400> 26

Leu Leu Asn Ser Thr Arg Pro Pro Leu Gly  
1 5 10

<210> 27  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis C  
  
<400> 27

Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Phe Leu Leu Asn Ser Thr Arg Pro  
1 5 10 15

Pro Leu Gly

<210> 28  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis C  
  
<400> 28

Phe Arg Val Gly Trp Gly Ala Leu Gln Tyr  
1 5 10

ES 2 564 586 T3

<210> 29  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 29

Phe Arg Val Gly Trp Gly Ala Leu Gln Tyr Glu Asp Asn  
1 5 10

<210> 30  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 30

Gly Ala Pro Pro Cys Arg Thr Arg Ala Asp  
1 5 10

<210> 31  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 31

Lys Thr Cys Gly Ala Pro Pro Cys Arg Thr Arg Ala Asp  
1 5 10

<210> 32  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 32

Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly  
1 5 10

<210> 33  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 33

Asn Tyr Thr Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly  
1 5 10