(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 796 479**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/576 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2017 PCT/EP2017/063077**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2017 WO17207595**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2017 E 17728121 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3465216**

(54) Título: **Procedimiento de pretratamiento para la detección rápida del antígeno central del VHC**

(30) Prioridad:

31.05.2016 EP 16172155

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2020

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

UPMEIER, BARBARA;
ZARNT, TORALF;
GINTER, MANFRED y
BOLLHAGEN, RALF

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 796 479 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de pretratamiento para la detección rápida del antígeno central del VHC

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar un polipéptido central de un virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra de un sujeto que comprende (a) poner en contacto dicha muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico; (b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión; y (c) detectar un polipéptido central de dicho VHC en dicha muestra; en el que la etapa a) está seguida inmediatamente de la etapa b). La presente invención se refiere además a un procedimiento para preprocesar una muestra de un sujeto para la detección de un polipéptido central del VHC, que comprende (a) poner en contacto dicha muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico y con un agente que induce una variación de pH, seguido inmediatamente de b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión. Además, la presente invención se refiere además a usos, dispositivos y sistemas analíticos relacionados con los procedimientos mencionados anteriormente.

Técnica relacionada

Los virus de la hepatitis C (VHC) son virus pequeños y con envoltura de la familia *Flaviviridae*, género *Hepacivirus*, que comprenden un ARN monocatenario de cadena + como genoma. En la partícula de VHC, la proteína central se asocia con el genoma de ARN, formando una estructura similar a cápside, que está rodeada por una membrana que comprende las glucoproteínas víricas E1 y E2. El VHC comprende al menos seis o siete genotipos y se identificaron como los agentes causales de la hepatitis C, también conocida como hepatitis no A, no B.

El diagnóstico de la infección por VHC normalmente se realiza en muestras derivadas de sangre, típicamente detectando inmunológicamente la proteína central vírica o detectando anticuerpos anti-VHC, o ambos, o detectando el genoma vírico por PCR. Un aspecto importante, en general, en los inmunoensayos para detectar el VHC y, en particular, para detectar el polipéptido central del VHC es la provisión de una prueba altamente sensible y altamente específica que detecte de forma fiable las muestras infectadas en todas las fases después de la infección, mientras que el número de resultados falsos, como, por ejemplo, positivos falsos, permanezca lo más pequeño posible. Además, la susceptibilidad a las interferencias también es indeseable, ya que esto da lugar a menudo a resultados inciertos o falsos que hacen necesaria una investigación más costosa y que requiera mucho más tiempo. Los procedimientos inmunológicos usados en la técnica incluyen diversas combinaciones de tratamientos ácidos o neutros en presencia de detergentes y/o agentes caotrópicos (documentos EP 0 967 484 A1, EP 1 020 727 A1, EP 1 691 198 A1) o el tratamiento de una muestra o virus sedimentado de la misma con agentes caotrópicos a pH alcalino (documentos JP 1999178174A; EP 2 327 987 A2; Tanaka *et al*. (1995), J Hepatol 23: 742), con el objetivo de desensamblar partículas víricas para incrementar la sensibilidad del ensayo. También se usaron concentraciones con alto contenido de sal para el mismo propósito (documento EP 1 083 428 A2). Los procedimientos conocidos en la técnica para detectar el VHC incluyen una etapa de incubación que mantiene la muestra en las condiciones mencionados anteriormente durante de 10 a 60 minutos o incluso más para garantizar una desnaturalización completa y, por tanto, obtener una sensibilidad óptima. Sin embargo, la adición de un tiempo de incubación a un ensayo reduce el rendimiento, lo que es indeseable, en particular, en el análisis clínico de alto rendimiento moderno.

Problema que se va a resolver

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar medios y procedimientos mejorados para detectar el VHC evitando al menos en parte las desventajas de la técnica anterior, en particular, con respecto a un incremento del rendimiento.

Sumario de la invención

Este problema se resuelve por los medios y procedimientos de la presente invención, con los rasgos característicos de las reivindicaciones independientes. Los modos de realización preferentes, que se podrían llevar a cabo de forma aislada o en cualquier combinación arbitraria, se enumeran en las reivindicaciones dependientes.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar un polipéptido central de un virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra de un sujeto que comprende

(a) poner en contacto dicha muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico;

(b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión; y

(c) detectar un polipéptido central de dicho VHC en dicha muestra;

en el que la etapa a) está seguida inmediatamente de la etapa b). Inmediatamente es un margen de tiempo de desde un segundo a menos de cinco minutos, en el que el margen de tiempo entre las etapas a) y b) comienza añadiendo

dicho tensioactivo a dicha muestra y finaliza añadiendo dicho compuesto de unión.

La etapa (a) comprende además poner en contacto dicha muestra con un agente que induce una variación de pH de al menos 2 unidades de pH.

Como se usa en lo que sigue, los términos "tener", "comprender" o "incluir" o cualquier variación gramatical arbitraria de los mismos se usan de modo no exclusivo. Por tanto, estos términos se pueden referir tanto a una situación en la que, además del rasgo característico introducido por estos términos, no estén presentes otros rasgos característicos en la entidad descrita en este contexto como a una situación en la que estén presentes uno o más de otros rasgos característicos. Como ejemplo, las expresiones "A tiene B", "A comprende B" y "A incluye B" se pueden referir tanto a una situación en la que, además de B, ningún otro elemento está presente en A (es decir, una situación en la que A consiste única y exclusivamente en B) como a una situación en la que, además de B, uno o más de otros elementos están presentes en la entidad A, tal como un elemento C, los elementos C y D o incluso otros elementos.

Además, como se usa en lo que sigue, los términos "preferentemente", "más preferentemente", "lo más preferentemente", "en particular", "más en particular", "específicamente", "más específicamente" o términos similares se usan junto con rasgos característicos opcionales, sin restringir otras posibilidades. Por tanto, los rasgos característicos introducidos por estos términos son rasgos característicos opcionales y no pretenden restringir el alcance de las reivindicaciones de ningún modo. La invención, como reconocerá el experto en la técnica, se puede realizar usando rasgos característicos alternativos. De forma similar, los rasgos característicos introducidos por "en un modo de realización de la invención" o expresiones similares pretenden ser rasgos característicos opcionales, sin ninguna restricción con respecto a otros modos de realización de la invención, sin ninguna restricción con respecto al alcance de la invención y sin ninguna restricción con respecto a la posibilidad de combinar los rasgos característicos introducidos de tal modo con otros rasgos característicos opcionales o no opcionales de la invención. Además, si no se indica de otro modo, el término "aproximadamente" se refiere al valor indicado con la precisión técnica aceptada comúnmente en el campo pertinente, en un modo de realización, se refiere al valor indicado ± 20 %.

El procedimiento para detectar un polipéptido central de un VHC de la presente invención, en un modo de realización, es un procedimiento *in vitro*. Además, puede comprender etapas además de las mencionadas de forma explícita anteriormente. Por ejemplo, otras etapas se pueden relacionar, por ejemplo, con obtener una muestra para la etapa (a), o calcular un valor de medición o un valor de medición corregido en la etapa (b); en particular, el procedimiento puede comprender además en la etapa (a) poner en contacto dicha muestra con un agente que induce una variación de pH. Además, se pueden realizar una o más de dichas etapas por un equipo automatizado.

Por tanto, en un modo de realización, el procedimiento para detectar un polipéptido central de un VHC comprende las siguientes etapas:

(a) poner en contacto una muestra con un agente que induce una variación de pH y con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico, creando, de este modo, una mezcla de reacción que permite que dicha muestra, dicho agente que induce una variación de pH y dicho tensioactivo interactúen, seguida inmediatamente de

(b) añadir, en un modo de realización añadir de forma consecutiva, al menos dos compuestos de unión que se unen específicamente a dicho polipéptido central, al menos uno de dichos al menos dos compuestos de unión es un compuesto de captura y al menos uno de dichos al menos dos compuestos de unión es un compuesto detector,

(c) formar una mezcla de inmunorreacción mezclando dicha mezcla de reacción con dichos compuestos de unión,

(d) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que dicho polipéptido central presente en dicha muestra inmunorreaccione con los al menos dos compuestos de unión para formar un producto de inmunorreacción, y

(e) detectar la presencia y/o la concentración de cualquiera de dicho producto de inmunorreacción.

Como se entenderá por el experto en la técnica, la detección de un polipéptido central de un virus en una muestra de un sujeto normalmente será indicativo de la presencia de un virus. En consecuencia, el procedimiento para detectar un polipéptido central de un VHC, en un modo de realización, es un procedimiento para detectar un VHC en una muestra de un sujeto que comprende

(a) poner en contacto dicha muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico;

(b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión;

(c) detectar un polipéptido central de dicho VHC en dicha muestra y, de este modo,

(d) detectar dicho VHC;

en el que la etapa a) está seguida inmediatamente de la etapa b).

En un modo de realización, en los procedimientos mencionados anteriormente, el polipéptido central se detecta por un procedimiento de detección no discriminador del tamaño, es decir, en un modo de realización, un procedimiento que detecta un rasgo característico de dicho polipéptido central sin detectar la masa molecular del analito detectado. Por tanto, en un modo de realización, los procedimientos mencionados anteriormente comprenden un inmunoensayo de tipo sándwich, en particular, un inmunoensayo de tipo sándwich con anticuerpo doble, por ejemplo, un ELISA de tipo sándwich o un ECLIA de tipo sándwich.

En un modo de realización, el procedimiento para detectar un polipéptido central de un VHC tiene una tasa de recuperación promedio de al menos un 75 %, en un modo de realización, de al menos un 80 %, en otro modo de realización, de al menos un 85 %, en otro modo de realización, de al menos un 90 %, en otro modo de realización, de al menos un 95 %, en el que el término tasa de recuperación se refiere a la proporción, expresada en porcentaje, de la cantidad de polipéptido central detectado en una muestra por el procedimiento de la presente invención, a la cantidad de polipéptido central detectado en el mismo procedimiento, pero que comprende un tiempo de preincubación de la muestra con tensioactivo que comprende un detergente catiónico y un agente que induce una variación de pH, pero en ausencia de un compuesto de unión, durante 9 min. Por tanto, en un modo de realización, la tasa de recuperación se calcula como (señal obtenida con adición inmediata de compuesto de unión / señal obtenida con preincubación de 9 min * 100 %). En un modo de realización, la tasa de recuperación promedio se calcula como la media de las tasas de recuperación obtenidas en cinco muestras positivas para el antígeno del VHC.

El término "virus" se entiende por el experto en la técnica. El término "virus de la hepatitis C" o "VHC" se refiere al miembro del género *Hepacivirus*, también conocido por el experto en la técnica. En un modo de realización, el VHC es uno de los VHC descritos en Smith *et al*. (2014), Hepatology 59(1): 318. En otro modo de realización, el VHC es el genotipo 1 del VHC, en particular, que tiene un genoma como se especifica en el n.º de acc. de Genbank: NC_004102.1 GI:22129792; es el genotipo 2 del VHC, en particular, que tiene un genoma como se especifica en el n.º de acc. de Genbank: NC_009823.1 GI:157781212; es el genotipo 3 del VHC, en particular, que tiene un genoma como se especifica en el n.º de acc. de Genbank: NC_009824.1 GI:157781216; es el genotipo 4 del VHC, en particular, que tiene un genoma como se especifica en el n.º de acc. de Genbank: NC_009825.1 GI:157781208; es el genotipo 5 del VHC, en particular, que tiene un genoma como se especifica en el n.º de acc. de Genbank: NC 009826.1 GI:157781210; es el genotipo 6 del VHC, en particular, que tiene un genoma como se especifica en el n.º de acc. de Genbank: NC_009827.1 GI:157781214, o es el genotipo 7 del VHC, en particular, el genotipo 7a, en particular, que tiene un genoma como se especifica en el n.º de acc. de Genbank: EF108306.2 GI:763907344. En otro modo de realización, el VHC es el genotipo 1 del VHC, en particular, que tiene un genoma como se especifica en el n.º de acc. de Genbank: NC_004102.1 GI:22129792.

El término "poner en contacto", como se usa en el contexto de los procedimientos de la presente invención, se entiende por el experto en la técnica. En un modo de realización, el término se refiere a poner un compuesto, en particular, un tensioactivo que comprende un detergente catiónico y/o un agente que induce una variación de pH, de la presente invención en contacto físico con una muestra o con otro compuesto y, de este modo, permitir que el compuesto y el otro compuesto interactúen. En un modo de realización, el término "poner en contacto una muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico" se refiere a poner una muestra como se especifica en el presente documento en contacto con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico, es decir, poner en contacto una muestra diluida con un diluyente o una muestra no diluida con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico, en el que dicho diluyente no comprende un tensioactivo que comprende un detergente catiónico como se especifica en el presente documento. En consecuencia, en un modo de realización, obtener un sedimento de una muestra por centrifugación, opcionalmente precedido de una etapa de precipitación, y poner en contacto dicho sedimento con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico, no es poner en contacto una muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico de acuerdo con la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "mezcla de reacción" se refiere a cualquier mezcla que pone en contacto un primer compuesto con un segundo compuesto, por ejemplo, un tensioactivo que comprende un detergente catiónico con una muestra, lo que permite que dicho primer y segundo compuesto reaccionen.

El término "tensioactivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o a una mezcla de compuestos que tienen propiedades anfifílicas y que reducen la tensión superficial de un líquido que los comprende, en el que, en un modo de realización, el tensioactivo comprende un detergente catiónico. Como se usa en el presente documento, el término "detergente" se usa en un sentido amplio y se refiere a compuestos o mezclas que tienen propiedades tensioactivas. Los detergentes catiónicos son conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, detergentes de amonio cuaternario. En un modo de realización, el detergente catiónico es una sal de hexadeciltrimetilamonio, en un modo de realización, es cloruro de hexadeciltrimetilamonio (HTAC, número CAS 112–02-7). En otro modo de realización, el tensioactivo comprende además un detergente no iónico, es decir, el tensioactivo es una mezcla de un detergente catiónico y no iónico. En un modo de realización, el detergente no iónico es un alquilglucósido, en otro modo de realización, un n-alquilglucósido, en otro modo de realización, un octilglucósido (n–octil-β-D-glucósido, número CAS 29836-26-8). En un modo de realización, el tensioactivo consiste en dicho detergente catiónico y dicho detergente no iónico.

En un modo de realización, poner en contacto una muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico comprende poner en contacto dicha muestra con un detergente catiónico a una concentración de desde un 0,25 % (p/v) a un 1 % (p/v), en un modo de realización, de desde un 0,3 % (p/v) a un 0,8 % (p/v), en otro modo de realización, de desde un 0,4 % (p/v) a un 0,6 % (p/v), en otro modo de realización, de aproximadamente un 0,5 % (p/v), en otro modo de realización, de un 0,5 % (p/v). En un modo de realización, poner en contacto una muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico comprende además poner en contacto dicha muestra con un detergente no iónico a una concentración de al menos un 0,1 % (p/v), en un modo de realización, de desde un 0,1 % (p/v) a un 2,5 % (p/v), en otro modo de realización, de desde un 0,12 % (p/v) a un 1,5 % (p/v), en otro modo de realización, de desde un 0,15 % (p/v) a un 0,5 % (p/v). Por tanto, en un modo de realización, poner en contacto una muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico comprende diluir 2 partes de muestra con 1 parte de un reactivo de preprocesamiento que comprende el detergente catiónico a una concentración de desde un 0,75 % (p/v) a un 3 % (p/v), en un modo de realización, de desde un 0,9 % (p/v) a un 2,4 % (p/v), en otro modo de realización, de desde un 1,2 % (p/v) a un 1,8 % (p/v), en otro modo de realización, de aproximadamente un 1,5 % (p/v), en otro modo de realización, de un 1,5 % (p/v). En un modo de realización, dicho agente de preprocesamiento comprende además un detergente no iónico a una concentración de al menos un 0,3 % (p/v), en un modo de realización, de desde un 0,3 % (p/v) a un 7,5 %, en otro modo de realización, de desde un 0,36 % (p/v) a un 4,5 % (p/v), en otro modo de realización, de desde un 0,45 % (p/v) a un 1,5 % (p/v).

Como se usa en el presente documento, el término "inmediatamente" se usa en un sentido amplio y se refiere a un margen de tiempo de menos de cinco minutos. En un modo de realización, inmediatamente es un margen de tiempo de menos de 4 min, en otro modo de realización, de menos de 3 min, en otro modo de realización, de menos de 2 min, en otro modo de realización, de menos de 1 min, en otro modo de realización, de menos de 45 s, en otro modo de realización, de menos de 30 s, en otro modo de realización, de menos de 15 s. En otro modo de realización, el término inmediatamente se refiere a un margen de tiempo tan corto como sea técnicamente posible. Como se entenderá por el experto en la técnica, un margen de tiempo tan corto como sea técnicamente posible, en un modo de realización, es el periodo de tiempo que requiere un operario o máquina para añadir un compuesto de unión a una muestra después de que se haya añadido un tensioactivo que comprende un detergente catiónico y que es de menos de la cantidad de tiempo como se especifica anteriormente, en particular, es de menos de 1 min, en un modo de realización, es de menos de 45 s, en otro modo de realización, es de menos de 30 s, en otro modo de realización, es de menos de 15 s. Por tanto, en un modo de realización, el término inmediatamente se refiere a un periodo de tiempo que no comprende un tiempo de incubación dedicado para incubar la muestra con el tensioactivo que comprende un detergente catiónico en ausencia de un compuesto de unión. En un modo de realización, el término inmediatamente se refiere a un margen de tiempo de desde 1 s a menos de 5 min, en un modo de realización, de desde 2 s a 1 min, en otro modo de realización, de desde 5 s a 30 min, en otro modo de realización, de desde 10 s a 20 s. En un modo de realización, el margen de tiempo entre poner en contacto una muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico y poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión comienza añadiendo dicho tensioactivo a dicha muestra y finaliza añadiendo dicho compuesto de unión.

En un modo de realización, el procedimiento para detectar un polipéptido central de la presente invención comprende además poner en contacto la muestra con un agente que induce una variación de pH, en un modo de realización, antes, después y/o simultáneamente a poner en contacto dicha muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico. En un modo de realización, la muestra se pone en contacto simultáneamente con dicho agente que induce una variación de pH y con dicho tensioactivo. Como se entenderá por el experto en la técnica, el término "poner en contacto simultáneamente", en un modo de realización, se refiere a un procedimiento en el que la muestra se pone en contacto con el agente que induce una variación de pH y con el tensioactivo de tal modo que la muestra, el agente que induce una variación de pH y el tensioactivo estén presentes en una solución común durante al menos el tiempo requerido para añadir un agente de unión como se especifica en otra parte en el presente documento. En consecuencia, el tratamiento simultáneo incluirá un caso donde el agente que induce una variación de pH se neutraliza inmediatamente y, formalmente, ya no está presente. En un modo de realización, poner en contacto la muestra con un agente que induce una variación de pH y poner en contacto dicha muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico se consigue añadiendo una solución que comprende tanto dicho agente que induce una variación de pH como dicho tensioactivo que comprende un detergente catiónico a dicha muestra.

Como se usa en el presente documento, el término "variación de pH" se refiere a un cambio de pH de una muestra o una mezcla de muestra/reactivo de al menos 1 unidad de pH, en un modo de realización, de al menos 2 unidades de pH, en otro modo de realización, de más de 2 unidades de pH. En un modo de realización, una variación de pH es una disminución de pH de una muestra o una mezcla de muestra/reactivo de al menos 2 unidades de pH, o es un incremento de pH de una muestra o una mezcla de muestra/reactivo de al menos 3 unidades de pH. En un modo de realización, la variación de pH es una variación de pH repentina, es decir, una variación de pH que se produce dentro de como máximo 1 min, en un modo de realización, de como máximo 10 s. En un modo de realización, el pH de una solución acuosa se determina de acuerdo con DIN EN ISO 10523 (abril de 2012).

El término "agente que induce una variación de pH", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto químico que provoca que se produzca una variación de pH como se especifica en el presente documento en una muestra. En un modo de realización, el agente que induce una variación de pH es una base. En otro modo de realización, el agente que induce una variación de pH es un ácido.

El término "base", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que induce un incremento de pH en una solución acuosa. En un modo de realización, la base es una base de Brønsted-Lowry. En otro modo de realización, la base es un compuesto que comprende o que genera iones hidróxido en una solución acuosa. En otro modo de realización, la base es un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo, LiOH, NaOH, KOH o RbOH; o un hidróxido de metal alcalinotérreo, por ejemplo, $Be(OH)_2$, $Mg(OH)_2$ o $Ca(OH)_2$. En otro modo de realización, la base tiene un valor de pKB de como máximo 4, en un modo de realización, de como máximo 3, en otro modo de realización, de como máximo 2. En otro modo de realización, la base es hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, en particular, es hidróxido de potasio.

En un modo de realización, poner en contacto una muestra con una base comprende variar el pH en dicha muestra a al menos 10,5, en otro modo de realización, a al menos 11,6, en otro modo de realización, a al menos 11,75, en un modo de realización, a al menos 11,9, en otro modo de realización, a al menos 12, en otro modo de realización, a al menos 12,1. Como se entenderá por el experto en la técnica, un pH fuertemente alcalino puede provocar la hidrólisis de polipéptidos, incluyendo polipéptidos centrales. En consecuencia, en un modo de realización, el pH en la muestra se varía a como máximo 14, en otro modo de realización, a como máximo 13,2, en otro modo de realización, a como máximo 13. En otro modo de realización, el pH en la muestra se varía a de desde 11,75 a 12,75, en un modo de realización, de desde 11,9 a 12,6, en otro modo de realización, de desde 12 a 12,5. En otro modo de realización, poner en contacto una muestra con una base es poner en contacto una muestra con un tampón de pH como se indica anteriormente, en un modo de realización, un tampón que comprende un compuesto tampón que tiene al menos un pK_B a un pH como se indica anteriormente.

En un modo de realización, poner en contacto una muestra con una base comprende poner en contacto dicha muestra, en un modo de realización, con una solución acuosa de una base, en el que la concentración de dicha base en dicha solución es de desde 0,1 mol/l a 1 mol/l, en un modo de realización, es de desde 0,15 mol/l a 0,5 mol/l, en un modo de realización, es de desde 0,2 mol/l a 0,3 mol/l, en un modo de realización, es de aproximadamente 0,25 mol/l, en un modo de realización, es de 0,25 mol/l. En un modo de realización, la muestra y la solución de la base se mezclan en una proporción de aproximadamente 2:1 (muestra:solución de la base) en dicho caso, en otro modo de realización, en una proporción de 2:1 (muestra:solución de la base). Por tanto, en un modo de realización, poner en contacto una muestra con una base comprende añadir dicha base a dicha muestra hasta una concentración final de desde 0,05 mol/l a 0,17 mol/l, en un modo de realización, de desde 0,07 mol/l a 0,09 mol/l.

El término "ácido" se usa en el presente documento en un sentido amplio e incluye todos los compuestos que inducen una disminución de pH en una solución acuosa. Por tanto, el término ácido, en un modo de realización, incluye ácidos en el significado clásico del término, así como tampones que tienen un pH ácido. En un modo de realización, el ácido es un ácido de Brønsted-Lowry. En otro modo de realización, el ácido es un compuesto que comprende o que genera iones oxonio (iones hidronio) adicionales en una solución acuosa. En otro modo de realización, el ácido es un tampón orgánico o inorgánico que tiene un pH ácido como se especifica en otra parte en el presente documento. En otro modo de realización, el tampón ácido tiene un valor de pK_A de como máximo 6, en un modo de realización, de como máximo 5,5, en otro modo de realización, de como máximo 5. En un modo de realización, el ácido, en particular, el tampón ácido, tiene un pH de como máximo 6, en un modo de realización, de como máximo 5,5, en otro modo de realización, de como máximo 5. En otro modo de realización, el ácido es un tampón fosfato, en un modo de realización, es un tampón fosfato potásico que tiene un pH ácido, en particular, un pH de como máximo 6, en un modo de realización, de como máximo 5,5, en otro modo de realización, de como máximo 5.

En un modo de realización, poner en contacto una muestra con un ácido comprende variar el pH en dicha muestra a como máximo 6, en otro modo de realización, a como máximo 5,5, en otro modo de realización, a como máximo 5. Como se entenderá por el experto en la técnica, un pH fuertemente ácido puede provocar la hidrólisis de polipéptidos, incluyendo polipéptidos centrales. En consecuencia, en un modo de realización, el pH en dicha muestra se varía a al menos 2, en otro modo de realización, a al menos 3, en otro modo de realización, de al menos 4. En otro modo de realización, el pH en la muestra se varía a un pH de desde 3 a 6, en un modo de realización, de desde 4 a 5,75, en otro modo de realización, de desde 4,5 a 5,5. En otro modo de realización, poner en contacto una muestra con un ácido es poner en contacto una muestra con un ácido orgánico o inorgánico que induce un pH en la muestra como se indica anteriormente.

En un modo de realización, poner en contacto una muestra con un ácido comprende poner en contacto dicha muestra, en un modo de realización, con una solución acuosa de un ácido, en el que la concentración de dicho ácido en dicha solución es de desde 0,1 mol/l a 1 mol/l, en un modo de realización, es de desde 0,15 mol/l a 0,5 mol/l, en un modo de realización, es de desde 0,175 mol/l a 0,4 mol/l, en un modo de realización, es de aproximadamente 0,2 mol/l, en un modo de realización, es de 0,2 mol/l. En un modo de realización, la muestra y la solución del ácido se mezclan en una proporción de aproximadamente 2:1 (muestra:solución del ácido) en dicho caso, en otro modo de realización, en una proporción de 2:1 (muestra:solución del ácido). Por tanto, en un modo de realización, poner en contacto dicha muestra con un ácido comprende añadir 1 parte de solución de ácido de 0,2 mol/l, en particular, tampón ácido, a 2 partes de dicha muestra. Además, en un modo de realización, poner en contacto una muestra con un ácido comprende añadir dicho ácido a dicha muestra hasta una concentración final de desde 0,03 mol/l a 0,3 mol/l, en un modo de realización, de desde 0,05 mol/l a 0,17 mol/l.

En un modo de realización, los procedimientos de la presente invención se realizan a una temperatura de muestra y/o una temperatura de mezcla de muestra/reactivo de desde 10 °C a 50 °C, en un modo de realización, de desde 20 °C a 45 °C, en otro modo de realización, de desde 30 °C a 40 °C, en otro modo de realización, de 37±3 °C.

Como se entenderá, dependiendo, en particular, de la naturaleza del/de los compuesto(s) de unión usado(s), puede ser ventajoso neutralizar el agente que induce una variación de pH antes de poner en contacto la muestra con un compuesto de unión. Por tanto, en un modo de realización, el procedimiento comprende la etapa adicional de neutralizar el agente que induce una variación de pH antes o durante el contacto de dicha muestra con un compuesto de unión en la etapa b). Sin embargo, la neutralización también puede ser innecesaria, por ejemplo, en el caso de que la muestra tratada se diluya fuertemente después del tratamiento con el agente que induce una variación de pH y/o en caso de que el/los compuesto(s) de unión usado(s) sea(n) insensible(s) a condiciones no neutras. En un modo de realización, la muestra se neutraliza a un pH de 7±2, en un modo de realización, a un pH de 7±1,5, en otro modo de realización, a un pH de 7±1. El experto en la técnica conoce procedimientos apropiados para neutralizar un agente que induce una variación de pH en una solución acuosa. En un modo de realización, la neutralización se consigue añadiendo un compuesto tampón tamponado a un pH apropiado, en un modo de realización, añadiendo al menos 0,4 partes de un tampón de 0,1 a 0,2 mol/l, en otro modo de realización, un tampón fosfato de 0,1 a 0,2 mol/l, en otro modo de realización, un tampón fosfato de potasio de 0,1 a 0,2 mol/l con respecto a una parte de la mezcla de muestra/reactivo. En caso de que el agente que induce una variación de pH sea una base, en un modo de realización, el tampón de 0,2 mol/l mencionado anteriormente tiene un pH de desde 5,5 a 7,5, en otro modo de realización, de desde 6 a 7, en otro modo de realización, de aproximadamente 6,5, en otro modo de realización, de desde 6,3 a 6,5. En caso de que el agente que induce una variación de pH sea un ácido, en un modo de realización, el tampón de 0,1 mol/l mencionado anteriormente tiene un pH de desde 6 a 8, en otro modo de realización, de desde 6,5 a 7,5, en otro modo de realización, de aproximadamente 7, en otro modo de realización, de 7. En un modo de realización, la neutralización se realiza antes de que la muestra se ponga en contacto con un compuesto de unión de la presente invención. En otro modo de realización, el/los compuesto(s) de unión de la presente invención está(n) comprendido(s) en la solución de neutralización usada para la neutralización, es decir, la neutralización se realiza mientras se pone en contacto dicho VHC con un polipéptido de unión.

En un modo de realización, los polipéptidos presentes en la muestra no se retiran de la muestra antes de tratar dicha muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico. En un modo de realización, los polipéptidos desnaturalizados no se retiran de la muestra después del tratamiento de variación de pH, en particular, después de neutralizar la base. En otro modo de realización, los polipéptidos desnaturalizados no se solubilizan añadiendo un agente caotrópico.

Como se usa en el presente documento, el término "detección" se refiere a la detección de al menos un rasgo característico, en un modo de realización, un rasgo característico inmunológico, de un polipéptido central de un VHC que se va a detectar en la muestra, de forma cualitativa o cuantitativa. Un rasgo característico de acuerdo con la presente invención, en un modo de realización, es un rasgo característico estructural de un polipéptido central que facilita la detección del polipéptido central en una muestra, por ejemplo, por medio de un compuesto de unión que se une específicamente a dicho rasgo característico. En un modo de realización, dicho rasgo característico facilita la identificación, en otro modo de realización, la cuantificación del polipéptido central por medios inmunológicos. Los rasgos característicos utilizables típicos son rasgos característicos que facilitan la diferenciación de dicho polipéptido central de otros compuestos químicos presentes en una muestra. En un modo de realización, detectar un polipéptido central es establecer si un polipéptido central está presente o ausente en la muestra a un valor por encima del límite de detección del procedimiento. Los procedimientos para establecer un límite de detección para un procedimiento dado son conocidos por el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, experimentos de valoración por dilución. En otro modo de realización, la detección es detectar de forma semicuantitativa o cuantitativa la cantidad o valor de un polipéptido central o VHC en una muestra. Para la detección cuantitativa, se detectará la cantidad absoluta o precisa del polipéptido central o VHC o bien se detectará la cantidad relativa del polipéptido central o VHC. La cantidad relativa se puede detectar en un caso donde la cantidad precisa no se pueda detectar o no se detectará. En dicho caso, se puede detectar si la cantidad en la que está presente el polipéptido central o el VHC está incrementada o disminuida con respecto a una segunda muestra que comprende dicho polipéptido central o VHC en una segunda cantidad, en un modo de realización, predeterminada.

Como se entenderá por el experto en la técnica, el procedimiento de detección de un polipéptido central dependerá del formato de ensayo elegido. En un modo de realización, el ensayo es un ensayo de tipo sándwich en el que un analito, por ejemplo, un VHC, un capsómero del mismo, o un polipéptido central del mismo, se une a un compuesto de captura unido a una superficie sólida, y en el que se detecta la cantidad de analito capturado por la unión de un compuesto detector como se especifica a continuación en el presente documento a dicho analito capturado. En un modo de realización, el compuesto de captura y/o detector es un anticuerpo y el ensayo de tipo sándwich es un inmunoensayo de tipo sándwich. Como se entenderá por el experto en la técnica, en un modo de realización, un rasgo característico detectable del analito puede estar presente en el analito más de una vez; en dicho caso, tanto el compuesto de captura como el compuesto detector pueden reconocer dicho rasgo característico; o el compuesto de captura reconoce un primer rasgo característico y el compuesto detector reconoce un segundo rasgo característico, es decir, estructuralmente diferente. Sin embargo, un rasgo característico detectable específico del analito puede estar

presente en el analito solo una vez; en dicho caso, en un modo de realización, el compuesto de captura reconoce un primer rasgo característico y el compuesto detector reconoce un segundo rasgo característico, es decir, estructuralmente diferente.

En un modo de realización, el rasgo característico del VHC y/o del polipéptido central detectado es un epítopo comprendido en un polipéptido central de dicho VHC. El término "polipéptido central", en el contexto del VHC, es conocido por el experto en la técnica como que está relacionado con el polipéptido que se une al ARN vírico en la partícula vírica; por este motivo, el polipéptido central también se denomina "polipéptido de la cápside" o "proteína de la cápside", aunque el VHC no forme estructuras de cápside regulares como es conocido de la mayoría de los demás virus. Por tanto, en un modo de realización, el término polipéptido central se refiere a que el polipéptido es el componente estructural principal del centro vírico, en el que, en un modo de realización, un componente estructural de un centro es un componente que se requiere para formar un centro estructuralmente normal y/o para formar una partícula vírica infecciosa. En otro modo de realización, el polipéptido central es un polipéptido que está presente en un centro vírico en al menos 5 copias por cápside o estructura similar a cápside, en un modo de realización, al menos 10 copias por cápside o estructura similar a cápside. En otro modo de realización, el polipéptido central del VHC es el polipéptido central vírico p21 o p19, que comprende, en particular, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2.

El procedimiento de la presente invención comprende detectar un polipéptido central de un VHC, como se especifica anteriormente; en consecuencia, el "analito" que se va a detectar en dicho procedimiento, en un modo de realización, es dicho polipéptido central. Como se entenderá por el experto en la técnica, el procedimiento puede comprender además detectar otros analitos, por ejemplo, uno o más de otros polipéptidos centrales. Como también se entenderá por el experto en la técnica, la detección de un polipéptido central vírico como un analito, en un modo de realización, puede incluir la detección de oligómeros de dicho polipéptido central y/o puede incluir la detección de cápsides intactas.

En un modo de realización, la detección de un polipéptido central comprende poner en contacto la muestra con un compuesto de unión. Como se usa en el presente documento, el término "compuesto de unión" se refiere a una molécula química que se une al analito de la presente invención, en un modo de realización, a un polipéptido central. En un modo de realización, el compuesto de unión es una molécula orgánica o un complejo de la misma, en otro modo de realización, una macromolécula biológica, en particular, un polipéptido o un complejo del mismo. En un modo de realización, el compuesto de unión es un anticuerpo, en particular, un anticuerpo monoclonal. Por tanto, como se usa en el presente documento, el término "producto de inmunorreacción" se refiere, en un modo de realización específico, a un complejo entre al menos un anticuerpo y un polipéptido central de la presente invención, en particular, un polipéptido central del VHC. En un modo de realización, el compuesto de unión se une, indirecta o directamente, al analito de la presente invención con suficiente afinidad para permitir la detección del complejo que comprende el analito y el compuesto de unión. En un modo de realización, la constante de disociación (K_d) del complejo de analito/compuesto de unión es de como máximo 10^{-7} mol/l, en otro modo de realización, de como máximo 10^{-8} mol/l, en otro modo de realización, de como máximo 10^{-9} mol/l. En un modo de realización, el compuesto de unión se une, indirecta o directamente, al polipéptido central de la presente invención con suficiente afinidad para permitir la detección del complejo que comprende el polipéptido central y el compuesto de unión. En un modo de realización, el compuesto de unión es un compuesto que se une específicamente a un analito, en particular, a un polipéptido central, de la presente invención. En un modo de realización, el compuesto de unión se une específicamente a (i) polipéptido central tratado con álcali o a (ii) polipéptido central tratado con álcali y polipéptido central no tratado con álcali y/o se une específicamente a (i) polipéptido central tratado con ácido o a (ii) polipéptido central tratado con ácido y polipéptido central no tratado con ácido; por tanto, en un modo de realización, el compuesto de unión se une a un epítopo de un polipéptido central no desnaturalizado por tratamiento de variación de pH como se especifica en otra parte en el presente documento. En otro modo de realización, el compuesto de unión se une a un epítopo contiguo (lineal), es decir, un epítopo formado por aminoácidos que están contiguos en la secuencia de aminoácidos del analito, por ejemplo, el polipéptido central. Por tanto, en un modo de realización, el compuesto de unión es un compuesto de unión que no se une a un epítopo conformacional del analito. En un modo de realización, al menos un compuesto de unión se une a un epítopo correspondiente a los aminoácidos 157-169 de una proteína central del VHC, en un modo de realización, correspondiente a los aminoácidos 157-169 de la SEQ ID NO:1. En otro modo de realización, al menos un compuesto de unión se une a un epítopo correspondiente a los aminoácidos 102-112 de una proteína central del VHC, en un modo de realización, correspondiente a los aminoácidos 102-112 de la SEQ ID NO:1. En un modo de realización, al menos un compuesto de unión se une a un epítopo correspondiente a los aminoácidos 157-169 de una proteína central del VHC, en un modo de realización, correspondiente a los aminoácidos 157-169 de la SEQ ID NO:1, y al menos otro compuesto de unión se une a un epítopo correspondiente a los aminoácidos 102-112 de una proteína central del VHC, en un modo de realización, correspondiente a los aminoácidos 102-112 de la SEQ ID NO:1.

Como apreciará el experto en la técnica, el término "que se une específicamente", o una variación gramatical del mismo, se usa para indicar que otros compuestos, típicamente biomoléculas, presentes en una muestra no se unen significativamente a un ligando, en particular, un compuesto de unión, de la presente invención; en un modo de realización, esto no excluye la unión de compuestos químicos, por ejemplo, compuestos interferentes, a regiones de los compuestos de unión no implicados en la interacción con el analito. En un modo de realización, el nivel de unión de un compuesto de unión a un compuesto distinto del analito da como resultado una afinidad de unión que es de como máximo un 10 % o menos, un 5 % o menos, un 2 % o menos o un 1 % o menos de la afinidad por el analito,

respectivamente.

En un modo de realización, detectar un polipéptido central comprende capturar un polipéptido central en una superficie sólida por medio de un compuesto de captura. Como se usa en el presente documento, el término "compuesto de captura" se refiere a un compuesto de unión fijado o adaptado para fijarse a una superficie sólida como se especifica en otra parte en el presente documento. Como se entenderá por el experto en la técnica, el compuesto de captura se puede fijar a una superficie sólida antes, simultáneamente o después de poner en contacto dicho compuesto de captura con una muestra. En un modo de realización, el compuesto de captura se fija simultáneamente a una superficie sólida al poner en contacto dicho compuesto de captura con una muestra, por ejemplo, mezclando dicha muestra, dicho compuesto de captura y dicha superficie sólida, que puede estar en forma de esferas en dicho caso. Como comprenderá el experto en la técnica, poner en contacto un compuesto de captura unido a una superficie sólida con una muestra permite separar específicamente un analito unido por dicho compuesto de captura, si está presente, de otros compuestos comprendidos en dicha muestra. Los procedimientos de fijación de compuestos de unión, por ejemplo, moléculas biológicas, típicamente polipéptidos, a superficies sólidas son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, unión por interacción hidrófoba, biotinilación y unión por medio de estreptavidina inmovilizada, unión covalente, interacción anticuerpo-antígeno, y similares, o una combinación de estas interacciones.

En un modo de realización, el compuesto de captura también puede ser un complejo de captura. En un modo de realización, el compuesto de captura es un anticuerpo. En otro modo de realización, el compuesto de captura es un anticuerpo monoclonal. En otro modo de realización, el compuesto de captura es un anticuerpo, es decir, un anticuerpo de captura, en particular, un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, el anticuerpo de captura se acopla de forma covalente a biotina.

En un modo de realización, detectar un polipéptido central comprende poner en contacto dicho polipéptido central con un compuesto detector. Como se usa en el presente documento, el término "compuesto detector" se refiere a un compuesto de unión enlazado a un indicador como se especifica en otra parte en el presente documento. En un modo de realización, el compuesto detector no está unido a una superficie sólida y no está adaptado para unirse a una superficie sólida. En un modo de realización, el compuesto detector es un compuesto que se une directamente al analito de la invención, en un modo de realización, a un polipéptido central. En un modo de realización, el compuesto detector también puede ser un complejo detector. El experto en la técnica sabe cómo enlazar un compuesto de unión o complejo de unión a un indicador, dependiendo del indicador seleccionado. En un modo de realización, el enlace entre el agente de unión y el indicador en el compuesto detector es un enlace covalente. En un modo de realización, el compuesto detector es un anticuerpo, es decir, un anticuerpo detector. En otro modo de realización, el compuesto detector es un anticuerpo monoclonal. En otro modo de realización, el compuesto detector es un anticuerpo, en particular, un anticuerpo monoclonal, acoplado de forma covalente a un complejo que comprende un ion rutenio, por ejemplo, un complejo tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II).

En un modo de realización, el compuesto de unión del compuesto de captura y el compuesto de unión del compuesto detector no son idénticos. En un modo de realización, al menos un compuesto de captura o compuesto de unión se une a un epítopo correspondiente a los aminoácidos 157-169 de una proteína central del VHC, en un modo de realización, correspondiente a los aminoácidos 157-169 de la SEQ ID NO:1. En otro modo de realización, al menos un compuesto detector o compuesto de unión se une a un epítopo correspondiente a los aminoácidos 102-112 de una proteína central del VHC, en un modo de realización, correspondiente a los aminoácidos 102-112 de la SEQ ID NO:1. En un modo de realización, al menos un compuesto de captura se une a un epítopo correspondiente a los aminoácidos 157-169 de una proteína central del VHC, en un modo de realización, correspondiente a los aminoácidos 157-169 de la SEQ ID NO:1. En otro modo de realización, al menos un compuesto detector se une a un epítopo correspondiente a los aminoácidos 102-112 de una proteína central del VHC, en un modo de realización, correspondiente a los aminoácidos 102-112 de la SEQ ID NO:1. En un modo de realización, al menos un compuesto de captura se une a un epítopo correspondiente a los aminoácidos 157-169 de una proteína central del VHC, en un modo de realización, correspondiente a los aminoácidos 157-169 de la SEQ ID NO:1, y al menos un compuesto detector se une a un epítopo correspondiente a los aminoácidos 102-112 de una proteína central del VHC, en un modo de realización, correspondiente a los aminoácidos 102-112 de la SEQ ID NO:1.

El término "indicador", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto adaptado para hacer detectable la presencia de una molécula o complejo que comprende dicho indicador. Típicamente, el indicador tiene una propiedad detectable, típicamente una propiedad óptica y/o enzimática. Sin embargo, también se contempla que dicha propiedad detectable sea la propiedad de emisión de radioactividad.

El término "propiedad óptica", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier propiedad que se puede detectar por un instrumento óptico. Específicamente, la propiedad ópticamente determinable puede ser o puede comprender al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en: una propiedad de reflexión, una propiedad de transmisión, una propiedad de emisión, una propiedad de dispersión, una propiedad de fluorescencia, una propiedad de fosforescencia, una propiedad de difracción y una propiedad de polarización. Otras propiedades ópticas contempladas por la presente invención son color, fluorescencia, luminiscencia o refracción. En un modo de realización, una propiedad ópticamente determinable como se hace referencia en el presente documento se refiere a una propiedad de un compuesto químico que se puede detectar ópticamente, tal como absorción de luz, emisión de

luz, remisión de luz o propiedades asociadas con las mismas. Se entenderá que detectar una propiedad ópticamente determinable como se usa en el presente documento engloba la detección de la presencia de una propiedad que no era detectable antes, la detección de la ausencia de una propiedad que se ha detectado antes y la detección de cambios cuantitativos de una propiedad, es decir, la detección del cambio de la intensidad de señal que se correlaciona con el grado del cambio de la al menos una propiedad óptica. Se entiende que el término "propiedad ópticamente determinable", en un modo de realización, también se refiere a electroquimioluminiscencia, que también es conocida como quimioluminiscencia electrogenerada.

El término "propiedad enzimática", como se usa en el presente documento, se refiere a una propiedad de un indicador de producir un producto detectable a partir de un sustrato por medio de catálisis biológica. En consecuencia, una propiedad enzimática típicamente se confiere por la presencia de un polipéptido que tiene dicha propiedad enzimática en dicho indicador. Típicamente, la propiedad enzimática es al menos una actividad enzimática seleccionada del grupo que consiste en: actividad fosfatasa (por ejemplo, en fosfatasa alcalina), actividad peroxidasa (por ejemplo, en peroxidasa de rábano picante) y actividad glucosidasa (por ejemplo, en beta-galactosidasa). Los sustratos típicos para actividades enzimáticas son bien conocidos en la técnica. Típicamente, dicha actividad enzimática produce un producto que tiene una propiedad óptica determinable como se especifica anteriormente en el presente documento, y/o dicha actividad enzimática produce un producto que es determinable por un instrumento eléctrico.

Como se usa en el presente documento, el término "superficie sólida" se refiere a cualquier superficie sólida adecuada adaptada para unirse al compuesto de captura de la presente invención y adaptada para separarse, por ejemplo, por medios físicos, de una muestra. En un modo de realización, dicha superficie sólida es una superficie de una esfera, en un modo de realización, una microesfera, por ejemplo, una microesfera magnética o paramagnética. En un modo de realización, dicha superficie está adaptada para mejorar la unión del compuesto de captura, por ejemplo, fijando, de forma covalente o no covalente, moléculas que se unen a una subestructura del compuesto de captura. Las moléculas típicas que se unen a una subestructura del compuesto de captura son, por ejemplo, anticuerpos, estreptavidina, iones níquel complejados y similares. En otro modo de realización, la superficie sólida se une a dicho compuesto de captura por enlaces covalentes y/o no covalentes, por ejemplo, por interacción hidrófoba. Por tanto, en un modo de realización, dicha superficie sólida es una superficie de una placa de múltiples agregados. En un modo de realización, se pretrata la superficie de la placa de múltiples agregados para incrementar la afinidad y/o capacidad por la unión de un compuesto de captura. Los pretratamientos adecuados son conocidos en la técnica.

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra que se sospecha que comprende VHC o partes constituyentes del mismo de la presente invención. En un modo de realización, la muestra es una muestra que se sospecha que comprende un polipéptido central, en particular, un polipéptido central del VHC, de la presente invención. En un modo de realización, la muestra es o comprende una muestra de un líquido corporal, una muestra de un tejido o un órgano, o una muestra de líquido de lavado/enjuague o un hisopado o frotis obtenido de una superficie corporal exterior o interior. En un modo de realización, se engloban las muestras de heces, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero, plasma o líquido lagrimal como muestras por el procedimiento de la presente invención. Las muestras se pueden obtener por el uso de cepillos, hisopos (de algodón), espátulas, líquidos de enjuague/lavado, dispositivos de biopsia en sacabocados, punción de cavidades con agujas o lancetas, o por instrumentación quirúrgica. Sin embargo, las muestras obtenidas por técnicas bien conocidas incluyendo, en un modo de realización, raspados, hisopados o biopsias del aparato genitourinario, regiones perianales, conducto anal, la cavidad bucal, el tubo aerodigestivo superior y la epidermis también se incluyen como muestras de la presente invención. Se pueden obtener líquidos libres de células de los líquidos corporales o los tejidos u órganos por técnicas de lisis, tales como homogeneización y/o por técnicas de separación, tales como filtración o centrifugación. En un modo de realización, se obtienen muestras de líquidos corporales que se sabe que comprenden VHC y/o polipéptidos centrales del VHC de la presente invención, es decir, en un modo de realización, sangre, plasma, suero, saliva o similares. Se debe entender que una muestra se puede procesar además para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. En particular, las células se pueden retirar de la muestra por procedimientos y medios conocidos en la técnica. En un modo de realización, la muestra es una muestra que comprende inmunoglobulinas, en un modo de realización, una muestra de sangre, suero o plasma, en otro modo de realización, una muestra de suero o plasma.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, en un modo de realización un mamífero, en otro modo de realización, un primate, en otro modo de realización, un ser humano. En un modo de realización, el sujeto de acuerdo con la presente invención es un sujeto que se sospecha que está infectado con VHC; en consecuencia, en un modo de realización, el sujeto es un sujeto que muestra al menos uno, en otro modo de realización, al menos dos síntomas de la infección por VHC como es conocido por el experto en la técnica y como se especifica en otra parte en el presente documento. Sin embargo, también se contempla que el sujeto sea un compañero sexual, un miembro de la familia, un miembro del hogar, un compañero de trabajo, un compañero de juego y/o un tutor de un sujeto al que se le ha diagnosticado una infección por VHC.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad de unión deseada como se especifica en otra parte en el presente documento. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen, en general, por ejemplo, en Abbas *et al*., Cellular and Mol. Immunology, 4.ª ed., W.B. Saunders, Co. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se define a continuación. Los términos se refieren, en particular, a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, en un modo de realización, que comprende la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario, nanoanticuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, en el que su nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')2 que tiene dos sitios de combinación con antígeno y todavía puede reticular el antígeno. "Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En un modo de realización, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv), se pueden enlazar de forma covalente un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera por un conector peptídico flexible, de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables (HVR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno. Conjuntamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo.

Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que solo comprenda tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una menor afinidad que todo el sitio de unión. El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson *et al*., Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Hollinger *et al*., PNAS USA 90 (1993) 6444-6448. También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al*., Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales comprendidos en la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades sin importancia. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a un analito, en el que la secuencia polipeptídica de unión a analito se obtuvo por un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a analito de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un único clon de una pluralidad de clones, tal como una agrupación de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Se debe entender que una secuencia de unión a diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Por el contrario, con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en tanto que típicamente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

Se pueden obtener anticuerpos o fragmentos de los mismos usando procedimientos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales por las técnicas descritas originalmente en Köhler y Milstein, Nature 256 (1975), 495, y Galfré, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3, que comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con células de bazo derivadas de mamíferos inmunizados.

En un modo de realización, el procedimiento para detectar un polipéptido central de la presente invención comprende además poner en contacto dicha muestra con otros compuestos. Otros compuestos que se pueden usar

simultáneamente para el tratamiento con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico pueden incluir, sin limitación, halogenuros de metal alcalino, en un modo de realización, cloruros de metal alcalino, en particular, cloruro de potasio, en un modo de realización a una concentración de desde 0,1 mol/l a 1 mol/l, en un modo de realización, de desde 0,2 mol/l a 0,5 mol/l, en otro modo de realización, de aproximadamente 0,375 mol/l, en otro modo de realización, de 0,375 mol/l: Además, en un modo de realización, el procedimiento para detectar un polipéptido central de la presente invención comprende además, después del tratamiento con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico, poner en contacto dicha muestra con otros compuestos usados comúnmente en ensayos de detección, en particular, ensayos inmunológicos, como tampones, por ejemplo, tampones fosfato de potasio, otros detergentes, incluyendo detergentes aniónicos, no iónicos y/o de iones dipolares, conservantes, polipéptidos o mezclas de los mismos, por ejemplo, seroalbúmina bovina, inmunoglobulinas y similares.

En un modo de realización, el procedimiento para detectar un polipéptido central de la presente invención no comprende poner en contacto la muestra con un compuesto de sulfhidrilo. En otro modo de realización, el procedimiento para detectar un polipéptido central de la presente invención no comprende poner en contacto la muestra con un agente reductor. El término "compuesto de sulfhidrilo", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, en un modo de realización, compuestos orgánicos, que comprenden al menos un grupo -SH, como, por ejemplo, ditiotreitol, β-mercaptoetanol, β-mercaptoetanamina, ácido β-mercaptoetanosulfónico y similares. El término "agente reductor" se entiende por el experto en la técnica. En un modo de realización, el término se refiere a un agente que reduce los grupos -S-S- de los polipéptidos.

En otro modo de realización, el procedimiento para detectar un polipéptido central de la presente invención no comprende poner en contacto la muestra con un agente caotrópico, tal como urea. El término "agente caotrópico", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que altera la estructura terciaria de macromoléculas, en particular, de polipéptidos. En un modo de realización, de acuerdo con la presente invención, los detergentes catiónicos y los detergentes no iónicos no son agentes caotrópicos.

De forma ventajosa, en el trabajo que subyace a la presente invención se descubrió que para detectar los polipéptidos centrales del VHC, no se requiere una incubación prolongada de la muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico. De forma sorprendente, se descubrió que el efecto del tensioactivo que comprende un detergente catiónico es esencialmente inmediato y que la adición de anticuerpos de detección puede seguir inmediatamente a la adición del tensioactivo.

Las definiciones realizadas anteriormente se aplican *mutatis mutandis* a lo que sigue. Las definiciones y explicaciones adicionales realizadas más adelante también se aplican a todos los modos de realización descritos en la presente memoria descriptiva *mutatis mutandis*.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para preprocesar una muestra de un sujeto para la detección de un polipéptido central del VHC, que comprende (a) poner en contacto dicha muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico y con un agente que induce una variación de pH, seguido inmediatamente de (b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión.

El procedimiento para preprocesar una muestra de un sujeto también puede comprender etapas además de las mencionadas de forma explícita. Además, el procedimiento, en un modo de realización, es un procedimiento *in vitro*.

Además, la presente invención se refiere a un uso de un reactivo de preprocesamiento para detectar el VHC en una muestra, comprendiendo dicho reactivo de preprocesamiento un tensioactivo que comprende un detergente catiónico y, opcionalmente, un agente que induce una variación de pH, en el que dicho uso comprende poner en contacto dicha muestra con dicho agente de preprocesamiento, seguido inmediatamente de poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión.

El término "reactivo de preprocesamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a una solución, en un modo de realización, una solución acuosa, que comprende los componentes indicados usados para pretratar una muestra antes de poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión. Como se entenderá por el experto en la técnica, el término "pretratamiento" se refiere a una etapa de trabajo, típicamente opcional, en un procedimiento de detección, por ejemplo, un procedimiento de diagnóstico de la presente invención, realizado antes de la etapa de detección real y con el objetivo de mejorar el resultado de dicha etapa de detección. Por tanto, otras etapas de pretratamiento se pueden relacionar, por ejemplo, con la homogeneización de una muestra de tejido, la extracción de glóbulos sanguíneos de una muestra de sangre y similares. En un modo de realización, el reactivo de preprocesamiento es un agente concentrado tres veces, es decir, 1 parte del reactivo de preprocesamiento se diluye con 2 partes de reactivo distinto a de preprocesamiento, por ejemplo, en un modo de realización, con 2 partes de muestra, en el que dicha muestra se puede diluir con un diluyente apropiado o, en otro modo de realización, es una muestra no diluida. En un modo de realización, el tensioactivo comprende además un detergente no iónico como se especifica en otra parte en el presente documento. En un modo de realización, el reactivo de preprocesamiento no comprende un compuesto que comprende un grupo sulfhidrilo (-SH) como se especifica en otra parte en el presente documento, en un modo de realización, no comprende un agente reductor. En un modo de realización, el reactivo de preprocesamiento comprende un halogenuro de metal alcalino, en un modo de realización, un cloruro de metal

alcalino, en particular, cloruro de potasio. En un modo de realización, dicho halogenuro de metal alcalino está comprendido en el reactivo de preprocesamiento a una concentración de desde 0,5 mol/l a 2 mol/l, en un modo de realización, de desde 1 mol/l a 1,5 mol/l, en otro modo de realización, de aproximadamente 1,125 mol/l, en otro modo de realización, de 1,125 mol/l.

Además, la presente invención también se refiere a un dispositivo analítico para detectar un polipéptido central del VHC en una muestra, que comprende una unidad de análisis con una unidad de tratamiento de muestras, estando conectada dicha unidad de análisis a una unidad de controlador, estando adaptada dicha unidad de controlador para dirigir las siguientes etapas que se van a realizar:

(a) poner en contacto una muestra aplicada a dicha unidad de tratamiento de muestras con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico y con un agente que induce una variación de pH, seguida inmediatamente de

(b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión.

En un modo de realización, la unidad de tratamiento de muestras de la unidad de análisis está conectada a una unidad de controlador, estando adaptada dicha unidad de controlador para dirigir las etapas como se especifica anteriormente que se van a realizar.

El término "dispositivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de medios que comprende al menos los medios mencionados anteriormente enlazados de forma funcional entre sí para permitir que se obtenga el resultado de la detección. Los medios preferentes para poner en contacto una muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico y para detectar un polipéptido central se divulgan anteriormente en relación con los procedimientos de la invención. Cómo se enlazan los medios de manera funcional dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. En un modo de realización, los medios están comprendidos por un único dispositivo. De acuerdo con la invención, el dispositivo está adaptado para posibilitar que la etapa (a) como se indica anteriormente esté seguida inmediatamente de la etapa (b) como se indica anteriormente en el sentido de la presente invención, es decir, en un modo de realización, dentro de menos de 5 min, en un modo de realización, dentro de menos de 4 min, en otro modo de realización, dentro de menos de 3 min, en otro modo de realización, dentro de menos de 2 min, en otro modo de realización, dentro de menos de 1 min, en otro modo de realización, dentro de menos de 45 s, en otro modo de realización, dentro de menos de 30 s, en otro modo de realización, dentro de menos de 15 s. Por tanto, en un modo de realización, la unidad de controlador está configurada para dirigir las etapas como se indica que se van a realizar dentro del margen de tiempo especificado.

En un modo de realización, la unidad de tratamiento de muestras comprende un receptáculo para una muestra. El receptáculo se puede poner en contacto directamente con la muestra, o puede ser un receptáculo para otro medio que reciba la muestra, en el que el otro medio puede ser, por ejemplo, una placa de múltiples pocillos, a la que se puede aplicar una muestra o una multiplicidad de muestras. Además, la unidad de tratamiento de muestras, en un modo de realización, comprende un tensioactivo que comprende un detergente catiónico y, opcionalmente, un agente que induce una variación de pH, por ejemplo, en forma seca o en un depósito conectado a un medio de dosificación, por ejemplo, un tubo conectado a una bomba. Opcionalmente, la unidad de tratamiento de muestras puede comprender un medio neutralizante para reajustar el pH en la muestra después de poner en contacto la muestra con dicho agente que induce una variación de pH. En un modo de realización, la unidad de tratamiento de muestras comprende al menos un compuesto detector, por ejemplo, en forma seca o en un depósito conectado a un medio de dosificación, por ejemplo, un tubo conectado a una bomba. En otro modo de realización, la unidad de tratamiento de muestras comprende medios para mezclar y medios para ajustar la temperatura de una mezcla de reacción.

En un modo de realización, el resultado de la detección se puede obtener por inspección visual por el usuario o realizando una medición de detección en un dispositivo apropiado. En un modo de realización, la unidad de análisis del dispositivo de la presente invención comprende además una unidad de detección para detectar un polipéptido central de la presente invención, en un modo de realización para detectar la cantidad de un polipéptido central de la presente invención. Los medios adecuados como unidad de detección de acuerdo con la presente invención son conocidos por el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, dispositivos fotométricos. En un modo de realización, el dispositivo analítico es un dispositivo analítico para la detección electroquímica de un analito y comprende además al menos un electrodo, en un modo de realización, al menos un electrodo de trabajo. Como se entenderá por el experto en la técnica, el dispositivo analítico puede comprender electrodos adicionales, por ejemplo, un contraelectrodo y/o un electrodo de referencia; el dispositivo analítico también puede comprender un contraelectrodo/electrodo de referencia combinado. Son conocidos modos de realización de electrodos adecuados por el experto en la técnica. En un modo de realización, al menos el electrodo de trabajo está comprendido en el receptáculo para muestras del dispositivo o en los otros medios para recibir la muestra como se especifica anteriormente.

En un modo de realización, el dispositivo de la presente invención comprende además una unidad de salida de datos, conectada a la unidad de detección. La unidad de salida de datos, en un modo de realización, está adaptada para emitir los datos obtenidos por la unidad de detección. Las unidades de salida de datos adecuadas son conocidas por el experto en la técnica e incluyen unidades de salida simples, tales como una lámpara indicadora o una pantalla que indica que se detectó un polipéptido central por encima del umbral de detección. Sin embargo, una unidad de salida

también puede ser una interfaz para un dispositivo de evaluación, en la que dicha interfaz puede ser cualquier clase de medio de transferencia de datos, incluyendo, por ejemplo, conexiones por cable, como USB, conexiones inalámbricas, como LAN inalámbrica, bluetooth y similares, o conexiones indirectas, tales como la transferencia de datos por mensajería instantánea, correo electrónico o similares.

En un modo de realización, el dispositivo de la presente invención es parte de un sistema analítico, comprendiendo además dicho sistema analítico un dispositivo de evaluación. Como se entenderá por el experto en la técnica, el dispositivo de evaluación puede estar comprendido en la misma carcasa que el dispositivo de la invención, por ejemplo, como una unidad de evaluación, o puede ser un dispositivo separado. En un modo de realización, el dispositivo de evaluación comprende un microprocesador programado para recibir datos de salida desde una unidad de salida del dispositivo de la presente invención y para realizar operaciones lógicas que proporcionan una evaluación de dichos datos de salida. La evaluación de los datos de salida puede comprender, por ejemplo, corregir datos para valores medidos en una o más reacciones de detección de control, cálculos estadísticos, por ejemplo, calcular medias de dos o más reacciones de detección en paralelo, corregir datos para factores de dilución, comparar datos de salida con valores de referencia, compilar datos en una lista y similares. En un modo de realización, el dispositivo de evaluación comprende además una unidad de almacenamiento de datos. En otro modo de realización, dicha unidad de almacenamiento de datos comprende valores de referencia, por ejemplo, en una base de datos de valores de referencia. Además, en un modo de realización, la unidad de almacenamiento de datos está adaptada para almacenar datos de salida recibidos desde un dispositivo de la presente invención, como se especifica anteriormente.

En un modo de realización, donde se aplican medios para detectar de forma automática un polipéptido central de dicho virus, los datos obtenidos por dichos medios que funcionan de forma automática se pueden procesar, por ejemplo, por un programa informático para establecer un resultado analítico que respalde un diagnóstico (es decir, identificar un sujeto infectado con un VHC). Se divulgan medios de detección típicos en relación con modos de realización relacionados con los procedimientos de la invención anteriores. En dicho caso, los medios se enlazan de forma funcional en tanto que el usuario del sistema reúne el resultado de la determinación de la cantidad y el valor diagnóstico de la misma debido a las instrucciones e interpretaciones dadas en un manual. El experto en la técnica se dará cuenta de cómo enlazar los medios sin otras habilidades según la invención. Los dispositivos típicos son los que se pueden aplicar sin el conocimiento particular de un profesional clínico especialista, por ejemplo, tiras reactivas o dispositivos electrónicos que simplemente requieran su carga con una muestra. Los resultados se pueden dar como una emisión de datos brutos de diagnóstico paramétricos, preferentemente, como cantidades absolutas o relativas. Se debe entender que estos datos necesitarán una interpretación por el profesional clínico. Sin embargo, también se contemplan dispositivos de sistemas expertos en los que la emisión comprende datos brutos de diagnóstico procesados en los que su interpretación no requiere un profesional clínico especializado. Otros modos de realización de dispositivos comprenden las unidades/dispositivos de análisis (por ejemplo, biosensores, matrices, soportes sólidos acoplados a ligandos que reconocen específicamente los polipéptidos, dispositivos de resonancia de plasmón superficial, espectrómetros de RMN, espectrómetros de masa, etc.) o las unidades/dispositivos de evaluación a las que se hace referencia anteriormente de acuerdo con los procedimientos de la invención.

La presente divulgación se refiere además a y propone un programa informático que incluye instrucciones ejecutables por ordenador para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención en uno o más de los modos de realización incluidos en el presente documento cuando el programa se ejecuta en un dispositivo analítico, ordenador o red informática. Específicamente, el programa informático se puede almacenar en una unidad de almacenamiento de datos legible por ordenador. Por tanto, se pueden realizar específicamente, una, más de una o incluso todas las etapas de procedimiento como se indica anteriormente usando un ordenador o una red informática, preferentemente usando un programa informático.

La presente divulgación se refiere además a y propone un producto de programa informático que tiene medios de código de programa, para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención en uno o más de los modos de realización incluidos en el presente documento cuando el programa se ejecuta en un dispositivo analítico, ordenador o red informática. Específicamente, los medios de código de programa se pueden almacenar en una unidad de almacenamiento de datos legible por ordenador.

Además, la presente divulgación se refiere además a y propone una unidad de almacenamiento de datos que tiene una estructura de datos almacenada en la misma, que, después de cargarse en un ordenador o red informática, tal como en una memoria de trabajo o memoria principal del ordenador o red informática, puede ejecutar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento.

La presente divulgación se refiere además a y propone un producto de programa informático con medios de código de programa almacenados en una unidad de almacenamiento legible por máquina, para realizar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento, cuando el programa se ejecuta en un ordenador o red informática. Como se usa en el presente documento, un producto de programa informático se refiere al programa como un producto comercializable. El producto puede existir, en general, en un formato arbitrario, tal como en un formato impreso, o en una unidad de almacenamiento de datos legible por ordenador. Específicamente, el producto de programa informático se puede distribuir sobre una red de datos.

Finalmente, la presente divulgación se refiere además a y propone una señal de datos modulada que contiene instrucciones legibles por un sistema informático o red informática, para realizar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento.

En un modo de realización, en referencia a los aspectos implementados por ordenador de la divulgación, una o más de las etapas de procedimiento o incluso todas las etapas de procedimiento del procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento se pueden realizar usando un ordenador o red informática. Por tanto, en general, se puede realizar cualquiera de las etapas de procedimiento, incluyendo la provisión y/o manipulación de datos usando un ordenador o red informática. En general, estas etapas de procedimiento pueden incluir cualquiera de las etapas de procedimiento, típicamente excepto por las etapas de procedimiento que requieran un trabajo manual, tales como proporcionar las muestras y/o determinados aspectos de realización de las mediciones reales.

Específicamente, la presente divulgación se refiere además a:

- un ordenador o red informática que comprende al menos un procesador, en el que el procesador está adaptado para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción,

- una estructura de datos que se puede cargar en un ordenador que está adaptada para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción mientras se ejecuta la estructura de datos en un ordenador,

- un programa informático, en el que el programa informático está adaptado para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción mientras se ejecuta el programa en un ordenador,

- un programa informático que comprende medios de programa para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción mientras se ejecuta el programa informático en un ordenador o en una red informática,

- un programa informático que comprende medios de programa de acuerdo con el modo de realización precedente, en el que los medios de programa se almacenan en un medio de almacenamiento legible por un ordenador,

- un medio de almacenamiento, en el que una estructura de datos se almacena en el medio de almacenamiento y en el que la estructura de datos está adaptada para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción después de haberse cargado en un almacenamiento principal y/o de trabajo de un ordenador o de una red informática, y

- un producto de programa informático que tiene medios de código de programa, en el que los medios de código de programa se pueden almacenar o se almacenan en un medio de almacenamiento, para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción, si los medios de código de programa se ejecutan en un ordenador o en una red informática.

Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimientos

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. *et al*., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Síntesis de genes y oligonucleótidos

Se prepararon segmentos de genes deseados por síntesis química en Geneart GmbH (Ratisbona, Alemania). Los fragmentos de genes sintetizados se clonaron en un plásmido en *E. coli* para su propagación/amplificación. Las secuencias de ADN de los fragmentos de genes subclonados se verificaron por secuenciación de ADN. De forma alternativa, se ensamblaron fragmentos cortos de ADN sintético por hibridación de oligonucleótidos sintetizados químicamente o por medio de PCR. Los oligonucleótidos respectivos se prepararon en metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Alemania).

Descripción del plásmido de expresión en mamífero básico/estándar

Para la expresión de un gen/proteína deseado (por ejemplo, cadena pesada de anticuerpo de longitud completa, cadena ligera de anticuerpo de longitud completa o una cadena de Fc que contiene una oligoglicina en su extremo N) se usó una unidad de transcripción que comprendía los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador y promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,

- una región no traducida en 5' (5'UTR) de inmunoglobulina de la cadena pesada humana,

- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,

- un gen/proteína que se iba a expresar (por ejemplo, la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa) y

- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA de BGH).

Además de la unidad/casete de expresión que incluye el gen deseado que se va a expresar, el plásmido de expresión en mamífero básico/estándar contiene

- un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y

- un gen de betalactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas de los polipéptidos purificados se determinó determinando la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos del polipéptido o usando el procedimiento de BCA colorimétrico.

Anticuerpos monoclonales

Se han preparado anticuerpos monoclonales por la tecnología de hibridoma estándar como es conocido por el experto en la técnica o por técnicas de ácidos nucleicos recombinantes.

Se usó uno de los anticuerpos monoclonales seleccionados como compuesto de captura en los ejemplos a continuación y se une al epítopo en los aa 157-169 de la proteína central del VHC. Ya se ha divulgado un epítopo muy similar en el documento EP 1 308 507. Como compuesto de detección, se eligió un anticuerpo monoclonal que se podía unir al epítopo en los aa 102-112, un epítopo relacionado con los epítopos también descritos en los documentos EP 0 967 484 y EP 1 308 507. Para la inmunización de ratones, se usaron las secuencias antigénicas centrales del VHC de genotipo 1a de acuerdo con el n.º de acc. de Genbank: P26664.3 GI: 130455, que divulga la poliproteína completa codificada por el genotipo 1 del VHC. En particular, se usaron los péptidos de cualquiera de los aminoácidos 110-171 como proteína de fusión recombinante con SlyD de *Escherichia coli* siguiendo el procedimiento divulgado en los documentos WO 03/000878 A2, US 2009/0291892 A1, WO 2013/107633 A1 para la inmunización. En un enfoque adicional, se usaron múltiples péptidos de los aminoácidos 82-117 acoplados a KLH (hemocianina de lapa californiana) para la inmunización de acuerdo con procedimientos conocidos.

Ejemplo 2: Marcaje de anticuerpos

Acoplamiento de restos de biotina y rutenio, respectivamente, a los anticuerpos:

Los anticuerpos se obtuvieron y purificaron de acuerdo con los procedimientos del estado de la técnica que son completamente consabidos por un experto en la técnica.

Antes de su marcaje, solo se depuró el anticuerpo de detección. Se escindió con pepsina para obtener un fragmento $F(ab')_2$ y para eliminar el fragmento Fc propenso a interferencias (el procedimiento se describe por A. Johnstone y R. Thorpe en Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific (1987). El fragmento $F(ab')_2$ purificado se polimerizó además con el reticulante homobifuncional suberato de disuccinimidilo (DSS) y se aplicó a una cromatografía de filtración en gel en S400 para obtener el tamaño óptimo del polímero $F(ab')_2$ (el principio se describe en el documento DE3640412).

Para el acoplamiento, en general, se seleccionaron como diana los grupos ε-amino de lisina de los anticuerpos por compuestos activados con N-hidroxisuccinimida. A concentraciones de proteínas de 10 mg/ml, se hicieron reaccionar anticuerpos con reactivos de biotinilación activados con N-hidroxisuccinimida y reactivos de marcaje de rutenio activados con N-hidroxisuccinimida, respectivamente. La proporción marcador/proteína de reactivo de biotinilación o de marcaje de rutenio fue 5:1 o 15:1, respectivamente. El tampón de reacción fue fosfato de potasio 50 mM (pH 8,5), KCl 150 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se detuvo añadiendo L-lisina hasta una concentración final de 10 mM. Para evitar la inactivación hidrolítica de los marcadores, se prepararon las soluciones madre respectivas en DMSO seco (Sigma-Aldrich, Alemania). Después de la reacción de acoplamiento, se retiró la biotina/marcador libre sin reaccionar haciendo pasar el conjugado de anticuerpo bruto a través de una columna de filtración en gel (Superdex 200 HI Load) o por diálisis.

Ejemplo 3:

Ensayo del antígeno central del VHC Elecsys prototipo

Se realizó el ensayo del antígeno central del VHC Elecsys en un analizador cobas® e801 automático (Roche Diagnostics GmbH).

Se llevaron a cabo mediciones en un formato de ensayo de tipo sándwich. La detección de señales en el analizador cobas® e801 se basa en la electroquimioluminiscencia. En este ensayo de tipo sándwich, el conjugado de biotina (es decir, el anticuerpo de captura) se inmoviliza en la superficie de una esfera magnética recubierta con estreptavidina. El anticuerpo de detección tiene un catión rutenio complejado como resto de señalización. En presencia de analito, el complejo de rutenio se une por puentes a la fase sólida y emite luz a 620 nm después de la excitación en el electrodo de platino comprendido en la celda de medición del analizador cobas® e801. La emisión de señales está en unidades de luz arbitrarias. Se realizaron mediciones con muestras de suero y plasma humano positivas y negativas para el antígeno central del VHC adquiridas de varias fuentes.

Ensayo prototipo (con preincubación)

Para el pretratamiento ácido, el ensayo del antígeno central del VHC experimental se realizó como sigue. Se incubaron conjuntamente 30 µl de suero humano normal, de una muestra positiva para el antígeno del VHC o de una muestra de donante de sangre, y 15 µl de un detergente que contenía reactivo de pretratamiento PT (fosfato de potasio 200 mM, pH 5,0, KCl 1,125 M, cloruro de hexadeciltrimetilamonio (HTAC) al 1,5 %, octilglucósido al 0,5 %) durante 9 minutos para liberar el antígeno.

La preincubación estuvo seguida de la adición de 21 µl de conjugado de anticuerpo de captura-biotina de 2 µg/ml y 24 µl de conjugado de anticuerpo de detección-marcador de rutenio de 1 µg/ml en el mismo tampón de ensayo R1 y R2 (fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0, KCl 225 mM, taurodesoxicolato de sodio al 0,5 %, Zwittergent 3-14 al 0,3 %, Oxy-pyrion al 0,1 %, metilisotiazolinona al 0,01 %, seroalbúmina bovina al 0,2 %, IgG bovina al 0,2 %, 50 µg/ml de MAK33-IgG1, 50 µg/ml de MAK33-F(ab')$_2$-Poly, 50 µg/ml de MAK IgG2b/Fab2a-Poly). Después de un tiempo de incubación de 9 minutos adicional, se añadieron 30 µl de micropartículas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina y se incubaron durante otros 9 minutos. Posteriormente, se detectó el antígeno central del VHC (por medio de la señal electroquimioluminiscente generada en estos experimentos).

Para el pretratamiento alcalino, el ensayo fue el mismo, excepto en que el reactivo de pretratamiento PT fue KCl 1,125 M, HTAC al 1,5 %, octilglucósido al 0,5 %, KOH 0,25 M, y en que el tampón de ensayo R1 y R2 fue fosfato de potasio 200 mM, pH 6,5, KCl 225 mM, taurodesoxicolato de sodio al 0,5 %, Zwittergent 3-14 al 0,3 %, Oxy-pyrion al 0,1 %, metilisotiazolinona al 0,01 %, seroalbúmina bovina al 0,2 %, IgG bovina al 0,2 %, 50 µg/ml de MAK33-IgG1, 50 µg/ml de MAK33-F(ab')2-Poly, 50 µg/ml de MAK IgG2b/Fab2a-Poly.

Ensayo sin preincubación

Las condiciones fueron las mismas que para los ensayos prototipo, excepto en que se añadió el tampón R1, que comprendía el conjugado de anticuerpo de captura-biotina como se especifica anteriormente, tan rápido como fue posible con el dispositivo, que fue después de aprox. 12 s.

Los datos en la tabla 1 muestran los recuentos reales medidos en muestras positivas para el antígeno del VHC y en una muestra normal, así como la tasa de recuperación (=recuentos medidos sin preincubación/recuentos medidos con preincubación*100 %). La tasa de recuperación promedio sin preincubación para muestras positivas para el antígeno del VHC fue de un 95 % con pretratamiento ácido y fue de un 97,6 % con pretratamiento alcalino.

Tabla 1: Intensidad de señal (recuentos) obtenida con y sin preincubación y tasas de recuperación

pretratamiento		ácido			alcalino		
tiempo de preincubación		9 min	12 s		9 min	12 s	
	ID de muestra	recuentos	recuentos	Recuperación [%]	recuentos	recuentos	Recuperación [%]
muestra normal	n.º 960064560	804	819	102	745	850	114
muestras positivas para el antígeno del VHC	n.º 217293	70.628	68.339	97	41.555	45.455	109
	n.º 205104	474.400	445.373	94	428.523	398.552	93
	n.º 205085	63.799	62.268	98	41.273	42.477	103
	n.º 205081	1.237.948	1.225.819	99	1.174.223	1.125.757	96
	n.º 9174627	77.573	67.434	87	73.765	63.934	87

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostic GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG
Roche Diagnostics Operations, Inc

<120> RD33542PC

<130> Procedimiento de pretratamiento para la detección rápida del antígeno central del VHC

<150> EP16172155.0
<151> 31-05-2016

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 191
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 1

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

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

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

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

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly
65                  70                  75                  80

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp
                85                  90                  95

Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
            100                 105                 110

Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
        115                 120                 125

Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
    130                 135                 140

Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
145                 150                 155                 160
```

Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
165 170 175

Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala
180 185 190

<210> 2
<211> 177
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 2

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

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

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

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

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly
65 70 75 80

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp
85 90 95

Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
100 105 110

Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
115 120 125

Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
130 135 140

Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
145 150 155 160

Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
165 170 175

Phe

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar un polipéptido central de un virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra de un sujeto que comprende

(a) poner en contacto dicha muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico;

(b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión; y

(c) detectar un polipéptido central de dicho VHC en dicha muestra;

en el que la etapa a) está seguida inmediatamente de la etapa b), en el que inmediatamente es un margen de tiempo de desde un segundo a menos de cinco minutos, en el que el margen de tiempo entre las etapas a) y b) comienza añadiendo dicho tensioactivo a dicha muestra y finaliza añadiendo dicho compuesto de unión, y

en el que la etapa (a) comprende además poner en contacto dicha muestra con un agente que induce una variación de pH de al menos 2 unidades de pH.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha muestra se pone en contacto simultáneamente con dicho agente que induce una variación de pH y con dicho tensioactivo.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que inmediatamente es un margen de tiempo de menos de 5 min, en un modo de realización, de menos de 4 min, en otro modo de realización, de menos de 3 min, en otro modo de realización, de menos de 2 min, en otro modo de realización, de menos de 1 min, en otro modo de realización, de menos de 45 s, en otro modo de realización, de menos de 30 s, en otro modo de realización, de menos de 15 s.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho detergente catiónico es un detergente de amonio cuaternario, en un modo de realización, es una sal de hexadeciltrimetilamonio, en otro modo de realización, es cloruro de hexadeciltrimetilamonio (HTAC, número CAS 112-02-7).

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho tensioactivo comprende además un detergente no iónico, en un modo de realización, un alquilglucósido, en otro modo de realización, octilglucósido (n–octil-β-D-glucósido, número CAS 29836-26-8).

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho compuesto de unión es un compuesto detector, en un modo de realización, un anticuerpo detector.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha detección de un polipéptido central comprende capturar dicho polipéptido central en una superficie sólida por medio de un compuesto de captura, en un modo de realización, por medio de un anticuerpo de captura.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha detección de dicho polipéptido central comprende detectar dicho polipéptido central en un inmunoensayo de tipo sándwich.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho agente que induce una variación de pH es una base, en un modo de realización, es una base de Brønsted-Lowry, en otro modo de realización, es un compuesto que comprende o que genera iones hidróxido adicionales en una solución acuosa, en otro modo de realización, es un hidróxido de metal alcalino o un hidróxido de metal alcalinotérreo.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho agente que induce una variación de pH es un ácido, en un modo de realización, es un ácido de Brønsted-Lowry, en otro modo de realización, es un compuesto que comprende o que genera iones oxonio (iones hidronio) adicionales en una solución acuosa, en otro modo de realización, es un tampón que tiene un pH ácido.

11. Un procedimiento para preprocesar una muestra de un sujeto para la detección de un polipéptido central del VHC, que comprende (a) poner en contacto dicha muestra con un tensioactivo que comprende un detergente catiónico y con un agente que induce una variación de pH de al menos 2 unidades de pH, seguido inmediatamente de (b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión, en el que inmediatamente es un margen de tiempo de desde un segundo a menos de cinco minutos, y en el que el margen de tiempo entre las etapas a) y b) comienza añadiendo dicho tensioactivo a dicha muestra y finaliza añadiendo dicho compuesto de unión.

12. Uso de un reactivo de preprocesamiento para detectar el VHC en una muestra, comprendiendo dicho reactivo de preprocesamiento un tensioactivo que comprende un detergente catiónico y un agente que induce una variación de pH de al menos 2 unidades de pH, en el que dicho uso comprende a) poner en contacto dicha muestra con dicho agente de preprocesamiento, seguido inmediatamente de b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión, en el que inmediatamente es un margen de tiempo de desde un segundo a menos de cinco minutos, y en el

que el margen de tiempo entre las etapas a) y b) comienza añadiendo dicho tensioactivo a dicha muestra y finaliza añadiendo dicho compuesto de unión.

13. El uso de la reivindicación 12, en el que dicho reactivo de preprocesamiento comprende dicho detergente catiónico a una concentración de desde un 1,3 % (p/v) a un 2 % (p/v), y un detergente no iónico a una concentración de al menos un 0,25 % (p/v), en un modo de realización, de desde un 0,25 % (p/v) a un 2,5 %, en otro modo de realización, de desde un 0,3 % (p/v) a un 1,5 % (p/v).

14. Un dispositivo analítico para detectar un polipéptido central del VHC en una muestra, que comprende una unidad de análisis con una unidad de tratamiento de muestras, comprendiendo dicha unidad de tratamiento un receptáculo para una muestra, un tensioactivo que comprende un detergente catiónico, un agente que induce una variación de pH, y al menos un compuesto detector, estando conectada dicha unidad de análisis a una unidad de controlador, y estando adaptada dicha unidad de controlador para dirigir las siguientes etapas que se van a realizar:

(a) poner en contacto una muestra aplicada a dicha unidad de tratamiento de muestras con dicho tensioactivo que comprende un detergente catiónico y con un agente que induce una variación de pH de al menos 2 unidades de pH, seguida inmediatamente de

(b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de unión,

en el que inmediatamente es un margen de tiempo de desde un segundo a menos de cinco minutos, en el que el margen de tiempo entre las etapas a) y b) comienza añadiendo dicho tensioactivo a dicha muestra y finaliza añadiendo dicho compuesto de unión, y en el que la unidad de controlador está configurada para dirigir las etapas (a) y (b) que se van a realizar dentro del margen de tiempo especificado.

15. Un sistema analítico, que comprende el dispositivo analítico de la reivindicación 14 y un dispositivo de evaluación.