

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 812**

51 Int. Cl.:
G01N 33/576 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01956848 .4**
96 Fecha de presentación: **10.08.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1308730**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2003**

54 Título: **MÉTODO PARA DETECTAR O MEDIR VHB.**

30 Prioridad:
11.08.2000 JP 2000249202

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.02.2012

73 Titular/es:
**Advanced Life Science Institute, Inc.
10-23 Maruyamadai 2-chome Wako-shi
Saitama 351-0112, JP**

72 Inventor/es:
**MAKI, Noboru;
KIMURA, Tatsuji;
ODA, Yoko y
YAGI, Shintaro**

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 374 812 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

Método para detectar o medir VHB

5 Sector de la invención

La presente invención se refiere a un método para detectar o medir virus de la hepatitis B (VHB).

Antecedentes de la técnica

10

La hepatitis post-transfusional se refiere a hepatitis causada por transfusión, como su propio nombre indica, y el virus de la hepatitis B (VHB) es el primer virus identificado como virus causante de hepatitis post-transfusional. En el ensayo de antígenos de VHB, se han utilizado métodos para detectar antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HB) en cribado de sangre, y se han utilizado habitualmente métodos para detectar el antígeno e del virus de la hepatitis B (HBe) como marcador para la replicación del virus de la hepatitis B.

15

El antígeno HBe es una proteína del pre-núcleo (pre-core) expresada por el mismo promotor que el de la proteína del núcleo del virus de la hepatitis B (antígeno HBc) que constituye la partícula de VHB. Dado que esta proteína se produce y se secreta de forma agresiva durante la replicación de VHB, se piensa que la cantidad del antígeno HBe en la sangre refleja en gran medida la cantidad de VHB cuando el anticuerpo contra HBe está ausente. Sin embargo, una vez que la producción del anticuerpo contra HBe se ha iniciado, el antígeno HBe forma un complejo inmune que conduce al establecimiento de seroconversión en la que solamente puede ser detectado el anticuerpo contra HBe. En dichas muestras, no se detecta antígeno HBe y la cantidad de VHB no se refleja.

20

25

Por otro lado, se han descrito casos en los que, incluso en el estado de seroconversión que indica la quiescencia de hepatitis de tipo B, los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), un indicador de la actividad de hepatitis, pueden variar y dado, que el ADN del VHB se detectó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la presencia de un mutante pre-núcleo se confirmó. Los mutantes pre-núcleo significan que, dado que un codón en la posición 28 de la proteína prepro HBe mutó a un codón de terminación, el antígeno HBe ya no podía producirse o secretarse con un resultado de que el antígeno HBe se volvió negativo. En otras palabras, quedó claro que la medición del antígeno HBe y el anticuerpo en solitario no es suficiente para monitorizar portadores de VHB.

30

Con la extensión de los ensayos de amplificación de ácido nucleico (NAT), se ha prestado atención a la relación entre la cantidad de ADN del VHB y la patología de los portadores de VHB y, por consiguiente, los NAT se han utilizado principalmente para la monitorización después de la medicación con agentes antivirales.

35

Aunque ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, tales como el método de PCR y el método de TMA (Amplificación Basada en Transcripción) son métodos altamente sensibles para detectar fragmentos génicos, sin embargo, son complicados ya que requieren dos horas de tiempo de manipulación para extraer el ADN genómico del VHB de muestras de ensayo en el método manual, e implican varias etapas de procedimientos. Además, dichos complicados procedimientos aumentan las probabilidades de contaminación y, de este modo, aumentaban las posibilidades de muestras falsas positivas. Además, se requieren aptitudes técnicas para obtener valores cuantitativos de manera estable, y hay que prestar suma atención en el almacenamiento de las muestras de ensayo para detectar sustancias bioquímicamente inestables, tales como ADN. Esto hace difícil procesar una gran cantidad de muestras de una vez. Aunque las medidas contra la contaminación han mejorado y el tiempo de procesamiento para la extracción de ADN se ha reducido en los últimos años debido al desarrollo de equipo automatizado, aun se requieren instrumentos caros y, por consiguiente, el método no se ha utilizado generalmente excepto en instalaciones que procesan una gran cantidad de muestras. Además, dado que el cebador de ADN debe concordar con el gen diana, deben utilizarse varios tipos de cebadores, lo que plantea un problema, dado que el coste por ensayo aumenta en comparación con inmunoensayos.

40

45

50

En lugar de los métodos anteriores que detectan el genoma del VHB, se han desarrollado métodos para detectar directamente el antígeno del núcleo del VHB (antígeno HBc). Usuda y otros (Journal of Virological Methods [Diario de Métodos Viroológicos], 72: 95-103, 1998) desarrollaron un método para detectar el antígeno HBc en el suero utilizando un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por el antígeno del núcleo del VHB (HBc), y demostraron que éste tiene utilidad clínica de forma similar a los anteriores ensayos NAT que detectan el genoma viral. Este método, sin embargo, sigue teniendo problemas en varios puntos.

55

En primer lugar, en comparación con el método NAT, es menos sensible con un límite de detección de 10^5 copias/ml en términos de la cantidad de ADN del VHB y, por lo tanto, no puede utilizarse en ensayos de cribado de suero o monitorización.

60

Además, las etapas de procesamiento de muestras para la medición son complicadas y requieren tiempo, lo que plantea problemas cuando debe utilizarse en aplicaciones tales como cribado y monitorización. Por lo tanto, para el procesamiento de muestras de ensayo (sueros), se requiere un procesamiento de etapas múltiples para la concentración de partículas virales y la eliminación de componentes de suero, incluyendo tratamiento con el

65

anticuerpo policlonal de HBs (37°C, dos horas), procedimiento de centrifugado (10 minutos), eliminación del sobrenadante, tratamiento con surfactantes, tratamiento alcalino (35 minutos) y la adición de agentes neutralizantes. Dichos procesos requieren aptitudes técnicas altamente experimentadas y para alcanzar la reproducibilidad, aptitudes entrenadas y se requiere un tiempo de procesamiento, como mínimo, de tres horas. Además, debido a etapas de centrifugado, eliminación del sobrenadante etc., el método es refractario a la automatización, y hace difícil la manipulación a granel simultánea, y por lo tanto no es adecuado para aplicaciones que requieren la manipulación a granel desde el punto de vista del procesamiento.

Debido a estos problemas, no se ha llevado a la utilización práctica en ensayos de laboratorio.

Por otro lado, el sistema de detección del antígeno HBc tiene ventajas respecto al método NAT en los siguientes puntos. Por lo tanto, dado que el proceso de detección no está acompañado por un procedimiento de amplificación, tolera relativamente la contaminación. Además, dado que detecta proteína antigénica que es relativamente estable en lugar de sustancias bioquímicamente inestables tales como ADN, no es necesario tener un cuidado excesivo durante el almacenamiento de muestras de ensayo, lo que permite un transporte más fácil de las mismas.

Estas características son requisitos importantes en aplicaciones en las que se miden un gran número de muestras de ensayo, tales como en la gestión de la sangre y revisiones físicas. Sin embargo, el método dado a conocer para detectar el antígeno HBc no es adecuado para la automatización, debido al complicado pretratamiento, y no puede utilizarse en cribado o monitorización terapéutica debido a la baja sensibilidad y, por lo tanto, el método no ha utilizado las ventajas respecto al método NAT en su máxima extensión. Además, los métodos clínicamente útiles de medición deben abordar siempre los problemas de sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, facilidad de manejo y bajo coste y debe desarrollarse de forma intensiva para satisfacer todos estos.

La bibliografía hasta la fecha describe anticuerpos que reconocen la región de secuencia de los No. de aminoácidos mostrados en [] en el antígeno HBc.

[73-89]; A. Semiletov lu y otros, Bioorg Khim 20 (11), 1175-85 (1994)

[124-133], [135-147]; M. Sallberg y otros, J Gen Virol 74 (Pt7), 1335-40 (1993)

[N terminal], [134-140]; V. Skrivelis y otros, Scand J Immunol 37 (6), 637-43 (1993)

[2-10], [134-140], [138-154]; V. Bichko y otros, Mol Immunol 30(3), 221-31 (1993)

[126-135]; M. Sallberg y otros, Mol Immunol 28(7), 719-26 (1991)

[76-85]; M. Sallberg y otros, J Med Virol 33(4), 248-52 (1991)

[73-85], [107-118]; G. Colucci y otros, J Immunol 141(12), 4376-80 (1988)

[9-20], [78-83], [127-133], [133-145]; P. Pushko y otros, Virology 202(2), 912-20 (1994)

Utilizando estos anticuerpos junto con un método de pretratamiento de muestras de ensayo, es posible preparar un sistema para medir el antígeno HBc. Sin embargo, aún no se han establecido sistemas de medición altamente sensibles y altamente específicos.

Características de la invención

Aunque actualmente existen el método de PCR y el método de TMA en el ensayo NAT para VHB, estos tienen los problemas de que el coste de ensayo es alto y además el procedimiento es complicado. Además, dado que utilizan un método de amplificación génica, pueden causar falsos positivos cuando los cebadores para amplificación no son idénticos al ADN diana. Por otro lado, los inmunoensayos pueden llevarse a cabo fácilmente y a bajo coste, pero los métodos utilizados actualmente para el antígeno HBe como marcador para la replicación no pueden medir el antígeno HBe que aparece como complejo inmune en presencia del anticuerpo contra HBe. Además, aunque los métodos de medición del antígeno HBc muestran correlación con la cantidad de ADN del VHB, no se han aplicado en aplicaciones clínicas, dado que el pretratamiento es complicado y la sensibilidad no es suficiente.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención dar a conocer un método de medición de antígenos relacionados con el núcleo del VHB (antígenos HBe y HBc) incluso en presencia de anticuerpos relacionados con el núcleo del VHB (anticuerpos contra HBe y HBc), para su utilización en el cribado de hepatitis de tipo B y en la monitorización en el tratamiento de pacientes con hepatitis B crónica. Por lo tanto, se trata de dar a conocer un sistema de detección para antígenos relacionados con el núcleo del VHB que tenga una sensibilidad y especificidad iguales al ensayo NAT, y que pueda aplicarse fácilmente, con un pretratamiento sencillo, a un sistema de procesamiento a gran escala, tal como automatización.

La presente invención da a conocer medios para detectar o medir VHB con una alta sensibilidad, en los que las partículas de VHB y proteínas relacionadas con VHB en la sangre se desnaturalizan para dejar completamente expuestos los antígenos relacionados con el núcleo de VHB (antígenos HBe y HBc), y cuando los anticuerpos para los antígenos HBe y HBc están presentes, dichos anticuerpos se inactivan, y a continuación los antígenos HBe y HBc son detectados y cuantificados.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer un método para medir VHB, método que comprende detectar o cuantificar la presencia de antígenos HBe y HBc haciendo reaccionar a una muestra de ensayo que contiene VHB con una sonda que reconoce específicamente los antígenos HBe y HBc, tal como se expone en las reivindicaciones.

Además, en el presente documento se describe un kit para medir la presencia o ausencia de, un kit o un reactivo de diagnóstico para cuantificar VHB en muestras de ensayo, comprendiendo dicho kit o reactivo de diagnóstico un anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal descrito a continuación para su utilización en los anteriores inmunoensayos.

Además, en el presente documento se describe la línea celular de hibridoma HB44 (FERM BP-7232) que produce un anticuerpo monoclonal adecuado para su utilización como sonda para la detección de los anteriores antígenos HBe y HBc.

Además, en el presente documento se describe un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma HB44 (FERM BP-7232).

Además, en el presente documento se describe un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal, y un método para producirlos, reconociendo dichos anticuerpos a los aminoácidos No. 31-49 (SEC ID NO 1) del polipéptido del núcleo de VHB que no se han descrito como epítopos hasta la fecha.

Realización para llevar a cabo la invención

La presente invención se explicará ahora en detalle a continuación.

Los antígenos relacionados con el núcleo del VHB, tal como se utiliza en el presente documento, significan los antígenos HBe y HBc, e incluyen proteínas de fusión, proteínas fragmentadas y péptidos de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de los antígenos HBe y HBc se describen en la SEC ID NO: 3 y 4, respectivamente. En el antígeno HBc (aminoácidos No. 1-183) que comprende 183 aminoácidos, una secuencia de aminoácidos que comprende 149 aminoácidos en el extremo N-terminal se solapa con el antígeno HBe (aminoácidos No. -10-149), y se dice que el antígeno HBe es la proteína pre-núcleo de VHB. Al obtener un anticuerpo que reconoce específicamente esta región común, y a continuación al combinarlo con un método de pretratamiento para ensayar muestras para construir un sistema de ensayo, se hace posible medir los antígenos relacionados con el núcleo del VHB, incluso en presencia de anticuerpo.

En primer lugar, para obtener el antígeno HBc, un fragmento génico que comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 debe clonarse en un vector de expresión. El fragmento génico de interés puede prepararse separando el gen viral del suero de pacientes con VHB, y a continuación amplificando el gen de interés por PCR. Además, éste puede clonarse en un vector de expresión utilizando un sitio de enzima de restricción obtenido de un enlazador añadido durante la PCR y un sitio de enzima de restricción obtenido de un plásmido en el que se ha insertado el fragmento génico del mismo.

Por lo tanto, como huésped, pueden utilizarse procariontas tales como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis* y Actinomicetos, y como promotor, pueden utilizarse el operón triptófano sintasa (*trp*), el operón lactosa (*lac*), el promotor PL y PR del fago λ .

También pueden utilizarse eucariotas tales como levadura, células de insecto, células vegetales y células animales como huésped. Como promotor en el presente documento, pueden mencionarse 3-fosfoglicerato quinasa que es un promotor común para levadura etc., un promotor para enzimas glucolíticas tales como enolasa, un promotor para alcohol deshidrogenasa, un promotor viral para su utilización en células de mamífero tales como virus del poliovirus, y un promotor obtenido de adenovirus, virus de simio SV40, virus vacuna o citomegalovirus.

Además, los vectores pueden comprender una secuencia marcadora que permite la selección del fenotipo de células transformadas, tal como un gen resistente a ampicilina, tetraciclina y un origen de replicación, un terminador, un sitio de unión al ribosoma, según sea apropiado.

Posteriormente, para *E. coli* como ejemplo, más adelante se describe un método en el que un vector de expresión se transforma en una célula huésped, y el transformante se cultiva para que exprese el antígeno HBc, que a continuación se recupera.

Como método de transformación, puede aplicarse un método de transformación común tal como el método de

cloruro cálcico. Al transformar una *E. coli* huésped adecuada con un vector de expresión pATtrp-HBc, puede obtenerse una *E. coli* recombinante.

5 Como método de cultivo de *E. coli* recombinante, ésta puede cultivarse en un medio rico en nutrientes utilizado habitualmente para *E. coli* tal como el medio L, el medio YT y el medio M9-CA. Un vector de expresión preparado tal como se ha descrito anteriormente tiene un gen de resistencia a fármacos y, por consiguiente, cuando se va a cultivar una *E. coli* transformada, un fármaco correspondiente a éste debe añadirse preferentemente de antemano al medio a una concentración adecuada. Por ejemplo, cuando se cultiva una *E. coli* HB101 recombinante [pATtrp-HBC] obtenida transformando la cepa HB101 como *E. coli* con un vector de expresión pATtrp-HBc, solamente se requiere añadir ampicilina por adelantado al medio a una concentración de 20-200 µg/ml.

15 Cuando el gen de interés debe expresarse, la expresión es inducida permitiendo que un promotor cadena arriba del mismo funcione en un método adecuado. Por ejemplo, en el caso del vector mencionado anteriormente, el microorganismo se cultiva hasta que la masa de células alcanza cierto nivel en un medio adecuado y a continuación se añade IAA (ácido indolacético) para desencadenar la expresión génica. Para realizar una expresión génica eficaz, el IAA se añade preferentemente en la fase temprana o media del periodo de crecimiento logarítmico. Después de la inducción de la expresión, el cultivo continúa adicionalmente para permitir que los microorganismos acumulen la proteína de interés en la célula. Por ejemplo, en el caso de *E. coli* HB101 [pATtrp-HBc], al cultivar en un medio M9-CA suplementado con ampicilina a 37°C durante 13-16 horas, puede obtenerse una mayor cantidad de masa de células, y la proteína de interés puede obtenerse con un alto rendimiento.

25 La recogida y la purificación de la proteína de interés de las células obtenidas mediante cultivo pueden realizarse mediante tecnologías utilizadas habitualmente tales como ruptura ultrasónica de células, centrifugado y diversos procedimientos cromatográficos. Por lo tanto, cuando la proteína de interés se expresaba eficazmente en un método tal como se ha descrito anteriormente, muchas proteínas forman gránulos insolubles en la célula, mientras que el antígeno HBc forma partículas de HBc en la célula. Utilizando estas características, después de que las células se han suspendido en un tampón en un estado fisiológico tal como solución salina fisiológica, las células se rompen mediante tratamiento ultrasónico, las células trituradas se centrifugan, y las fracciones solubles se centrifugan adicionalmente para recoger las partículas de HBc. Las partículas de HBc recogidas se someten a filtración en gel, centrifugado en gradiente de densidad de sacarosa, y diálisis para obtener un antígeno HBc altamente purificado, que puede utilizarse como antígeno.

35 Anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales contra el antígeno HBc, el antígeno HBe y antígenos relacionados con el núcleo del VHB tales como un polipéptido que contiene las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID NO: 1 a 5 pueden ser preparadas fácilmente por un experto en la materia.

40 Los anticuerpos policlonales pueden prepararse inmunizando animales tales como ratas, conejos, cabras y ovejas regularmente con el antígeno HBc anterior o un polipéptido (denominado en lo sucesivo en el presente documento como el presente antígeno) solo o como un antígeno combinado con BSA o KLH en una mezcla con un adyuvante tal como un adyuvante completo de Freund, y a continuación recogiendo suero. Para obtener anticuerpos policlonales que tienen un sitio de reconocimiento específico, existe un método en el que un péptido parcial de la región de interés se utiliza como antígeno.

45 La preparación de anticuerpos monoclonales utilizando un hibridoma es bien conocida. Por ejemplo, ratones BALB/c etc., pueden inmunizarse regularmente con una administración intraperitoneal o subcutánea del anterior antígeno HBc o un polipéptido (denominado en lo sucesivo en el presente documento como el presente antígeno) solo o como un antígeno combinado con BSA o KLH en una mezcla con un adyuvante tal como un adyuvante completo de Freund. Cuando el valor cuantitativo de anticuerpos en la sangre ha aumentado, el presente antígeno se administra a la vena caudal como una inmunización final, y a continuación después de extraer el bazo de forma aséptica, éste se somete a fusión celular con una línea celular de mieloma de ratón adecuada para obtener un hibridoma. El presente método puede realizarse según el método de Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497, 1975).

55 El hibridoma obtenido en el método anterior se cultiva en un medio de cultivo adecuado, y a continuación una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo que reacciona específicamente con el presente antígeno puede seleccionarse y clonarse. Para la clonación de un hibridoma que produce anticuerpos, puede utilizarse el método del agar blando (Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976) además del método de la dilución limitante. Este hibridoma puede cultivarse en un medio de cultivo o en la cavidad abdominal de un ratón para producir un anticuerpo monoclonal en el medio de cultivo o en la ascitis.

60 A continuación, el anticuerpo policlonal en el suero o el anticuerpo monoclonal en el medio de cultivo o la ascitis puede purificarse mediante un método tal como cromatografía en columna Protein A. Como anticuerpo policlonal, es posible purificar anticuerpo que solamente reacciona con un antígeno específico mediante un método tal como cromatografía de afinidad utilizando un antígeno inmovilizado sobre un portador, y un anticuerpo que no reacciona con un antígeno específico puede obtenerse de forma similar.

65 Pueden prepararse moléculas que pueden utilizarse como sonda, además de los anteriores anticuerpos

monoclonales o anticuerpos policlonales. Por ejemplo, anticuerpos recombinantes etc., se describen con detalle en un revisión de Hoogenboon (Trends in Biotechnology [Tendencias en Biotecnología], 15: 62-70, 1997).

5 El anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal descrito en el presente documento puede utilizarse para la detección y cuantificación de antígenos relacionados con el núcleo del VHB como reactivos de ensayo en ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo enzimático inmunodot, radioinmunoensayo, ensayo basado en aglutinación, u otros inmunoensayos conocidos. Cuando se utilizan anticuerpos marcados para la detección, las marcas utilizadas incluyen fluoróforos, sustancias quimioluminiscentes, sustancias radiactivas, enzimas y similares.

10 Por ejemplo, cuando se utiliza un método que está basado en un sistema de ensayo "sándwich" para la detección de antígenos relacionados con el núcleo del VHB en la muestra de ensayo, los kits de diagnóstico utilizados incluyen uno o más anticuerpos inmovilizados sobre un soporte sólido (por ejemplo, una pared interna de un pocillo de microvaloración) y uno o más anticuerpos o fragmentos de los mismos unidos a una marca. Pueden utilizarse cualesquiera combinaciones de un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido y un anticuerpo marcado, y
15 puede seleccionarse una combinación que proporciona alta sensibilidad y alta especificidad.

Los soportes sólidos utilizados incluyen placas de microvaloración, tubos de ensayo, capilares, perlas (partículas de látex, hematíes, compuestos metálicos, etc.), membranas (liposomas), filtros y similares hechos de poliestireno, policarbonato, polipropileno, o polivinilo.

20 Las muestras de ensayo, tal como se utiliza en el presente documento, incluyen fluidos biológicos tales como sangre completa, plasma, suero, orina, saliva y líquido cefalorraquídeo, tejidos tales como tejido hepático y similares.

25 Según la presente invención, un importante requisito es un método de tratamiento en el que antígenos relacionados con el núcleo del VHB en la muestra de ensayo se realizan sin procedimientos complicados en un estado adecuado para una reacción de unión con una sonda, por ejemplo un anticuerpo monoclonal. En otras palabras, es importante inactivar el anticuerpo contra HBc o anticuerpo contra HBe, y liberar eficazmente el antígeno HBc contenido en partículas virales o el antígeno HBe unido a albúmina del suero, etc.

30 Por lo tanto, es imperativo que el pretratamiento en el método de medición de la presente invención no solamente pueda liberar eficazmente antígenos relacionados con el núcleo del VHB presentes en la muestra de ensayo, sino que también inactive el anticuerpo unido a antígenos relacionados con el núcleo del VHB contenidos en la muestra de ensayo. Por lo tanto, al añadir una solución que contiene SDS a la muestra de ensayo seguida de tratamiento con calor, los antígenos relacionados con el núcleo del VHB se liberan y la función de los anticuerpos relacionados con
35 el núcleo del VHB en la muestra de ensayo se destruye.

Además, según la presente invención es un requisito importante utilizar sondas tal como se definen en las reivindicaciones, que se unen específicamente a los antígenos desnaturalizados como anteriormente. Cuando se utilizan anticuerpos como sondas, es importante encontrar epítopos de antígenos relacionados con el núcleo del
40 VHB que persistan incluso después de dicho tratamiento desnaturalizante, y anticuerpos que puedan causar una reacción específica de antígeno-anticuerpo en el inmunoensayo, y combinaciones de los mismos. Según la presente invención, para preparar anticuerpos que cumplan estas propiedades, es importante inmunizar antígenos sometidos previamente a un tratamiento de desnaturalización con SDS, y además diseñar métodos de selección de anticuerpos. Al seleccionar anticuerpos que reaccionan en soluciones que contienen SDS para antígenos
45 inmovilizados previamente sometidos a procesos de desnaturalización, pueden obtenerse los anticuerpos adecuados para inmunoensayos de la presente invención. Cuando se seleccionan anticuerpos desde estos puntos de vista, se obtienen anticuerpos que reconocen regiones hasta la fecha no descritas. Como tales sitios de reconocimiento de anticuerpo, la presente invención presenta la región (SEC ID NO: 1) de los aminoácidos No. 31-49. En el presente documento también se describe la región (SEC ID NO: 2) de los aminoácidos No. 1-81 del polipéptido del núcleo del VHB. Además, como tal sitio de reconocimiento de anticuerpos, en el presente documento también se describe la región (SEC ID NO: 9) de los aminoácidos No. 21-40.

La utilidad de los anticuerpos que reconocen este epítipo se describirá en los ejemplos, y también pueden utilizarse anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales que tienen un epítipo similar. Dichos anticuerpos pueden prepararse fácilmente utilizando como antígeno el péptido parcial de la región de interés solo o en combinación con una proteína portadora tal como KLH y BSA. También es posible seleccionar anticuerpos que solamente reaccionan con la región de interés mediante un método en el cual el péptido parcial de la región de interés se utiliza como antígeno para el cribado de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos policlonales pueden purificarse inmovilizando antígenos de interés y realizando cromatografía de afinidad para obtener anticuerpos que solamente
60 reaccionan con antígenos específicos.

Por lo tanto, combinando un método de pretratamiento de la muestra y sondas específicas en un estado adecuado para la medición, es posible detectar y cuantificar de forma sencilla y sensible antígenos relacionados con el núcleo del VHB incluso en presencia de anticuerpos relacionados con el núcleo del VHB.

65 Además, utilizando el método de medición presentado mediante la presente invención, se hace posible preparar un

kit para medir la presencia o ausencia de VHB en la muestra de ensayo, y un kit y un reactivo de diagnóstico para cuantificarlo. El método de medición de la presente invención también proporciona medios para cribar y monitorizar pacientes con VHB.

5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención, pero debe observarse que estos no limitan el alcance de la reivindicación de ninguna manera.

10 Ejemplo 1. Expresión y purificación de antígenos relacionados con el núcleo del VHB

(A) Construcción de un plásmido que expresa el antígeno HBc

15 Un plásmido de expresión correspondiente a la región del núcleo del VHB se construyó de la siguiente manera. Cien μ l del suero del paciente se mezclaron con 100 μ l de una solución de extracción de ADN [Tris-HCl 1 M, pH 8,4, 10 μ l; EDTA 250 mM, 8 μ l; SDS al 10%, 40 μ l; NaCl 5 M, 8 μ l; 20 mg/ml de Proteinasa K, 10 μ l; ARNt (5 μ g/ml), 1 μ l; agua estéril, 23 μ l] y se incubaron a 54°C durante 30 minutos. Doscientos μ l de fenol/cloroformo (1:1) se le añadieron y se mezclaron y, después del centrifugado, se eliminó el sobrenadante, a lo que se añadieron 150 μ l de isopropanol y 7 μ l de NaCl 5 M y se dejó reposar a -20°C durante 1 hora. Después del centrifugado a 15.000 rpm y a 4°C durante 5 minutos, el precipitado se aclaró en etanol al 70%, y se centrifugó de nuevo a 15.000 rpm y a 4°C durante 5 minutos. El precipitado se secó al aire, y a continuación se disolvió en 20 μ l de agua estéril para preparar una solución de ADN del VHB.

25 Cinco μ l de esta solución de ADN del VHB se sometieron a PCR utilizando dos cebadores (5'-GAATTCATGGACATTGACCCGTATAAA-3' (SEC ID No. 6), 5'-GGATCCTAACATTGAGATTCCCGAGA-3' (SEC ID No. 7)). La PCR se realizó utilizando el GeneAmp™ (Kit de Reactivos de Amplificación de ADN, fabricado por Perkin Elmer Cetus) en condiciones de desnaturalización de ADN a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 1 minuto, y síntesis de ADN a 72°C durante 1 minuto, y los fragmentos obtenidos se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y se purificaron mediante el método de polvo de vidrio (GeneClean). El fragmento génico de HBc amplificado (0,5 μ g) se digirió en 20 μ l de una solución de enzima de restricción [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, ditiotreitól 1 mM, NaCl 100 mM, 15 unidades de EcoRI y 15 unidades de enzimas BamHI) a 37°C durante 1 hora, y a continuación se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para purificar un fragmento de EcoRI-BamHI de aproximadamente 570 pb.

35 A continuación, 0,5 μ g de ADN de pATtrp, un vector de expresión, se digirieron en 20 μ l de una solución de enzima de restricción [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, ditiotreitól 1 mM, NaCl 100 mM, 15 unidades de EcoRI y 15 unidades de enzimas BamHI) a 37°C durante 1 hora, y 39 μ l de agua se añadieron a la mezcla de reacción, que a continuación se trató con calor a 70°C durante 5 minutos, y se le añadió 1 μ l de una fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) (250 unidades/ μ l) y se incubó a 37°C durante 1 hora.

40 Añadiendo fenol a la mezcla de reacción, se realizó la extracción con fenol, y la fase acuosa obtenida se precipitó con etanol, y el precipitado se secó. A 0,5 μ g del ADN del vector tratado con EcoRI-BamHI obtenido, el fragmento de HBc de 570 pb mencionado anteriormente, 5 μ l de un tampón ligasa 10 x [Tris-HCl 660 mM, pH 7,5, MgCl₂ 66 mM, ditiotreitól 100 mM, ATP 1 mM] y 1 μ l de ligasa T4 (350 unidades/ μ l), se les añadió agua para preparar 50 μ l, que se incubó durante una noche a 16°C para realizar una reacción de ligamiento. Para obtener un plásmido de expresión pATtrp-HBc, esta reacción de ligamiento se utilizó para transformar E. coli HB101.

50 La cepa de E. coli sensible utilizada para la transformación puede crearse mediante el método de cloruro cálcico [Mandel, M. y Higa, A., J. Mol. Biol., 53: 159-162 (1970)]. La E. coli transformada se colocó en una placa de LB (triptona al 1%, NaCl al 0,5%, agar al 1,5%) que contenía 25 μ g/ml de ampicilina, y se incubó durante una noche a 37°C. De la colonia microbiana formada en la placa, se tomó una muestra con un asa de platino, y se transfirió al medio LB que contenía 25 μ g/ml de ampicilina, y se cultivó a 37°C durante una noche.

55 Se centrifugó 1,5 ml del cultivo microbiano y las células se recogieron, y a continuación se realizó la minipreparación de un ADN plasmídico mediante el método de álcali [Manniaty y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio], 1982]. Un μ g del ADN plasmídico obtenido se digirió en 20 μ l de una solución de enzima de restricción [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, ditiotreitól 1 mM, NaCl 100 mM, 15 unidades de EcoRI y 15 unidades de enzimas BamHI) a 37°C durante 1 hora, y se sometió a una electroforesis en gel de agarosa para seleccionar un plásmido de expresión pATtrp-HBc que proporciona aproximadamente 570 pb del fragmento EcoRI-BamHI.

(B) Expresión y purificación de un polipéptido que codifica el antígeno HBc

65 Una cepa de E. coli HB101 que porta un plásmido de expresión pATtrp-HBc se inoculó en 3 ml del medio 2YT (triptona al 1,6%, extracto de levadura al 1%, NaCl al 0,5%) que contenía 50 μ g/ml de ampicilina, y se cultivó a 37°C

5 durante 9 horas. Un ml de este cultivo se subcultivó en 100 ml del medio M9-CA (Na_2HPO_4 al 0,6%, KH_2PO_4 al 0,5%, NaCl al 0,5%, NH_4Cl al 0,1%, CaCl_2 0,1 mM, MgSO_4 2 mM, casaminoácido al 0,5%, glucosa al 0,2%), y se cultivó a 37°C. Cuando la $\text{DO}_{600} = 0,3$, se añadió ácido indolacético hasta una concentración final de 40 mg/l, y se cultivó adicionalmente durante 16 horas. Este cultivo se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos y las células se recogieron.

10 A las células, se les añadieron 20 ml de tampón A [Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 30 mM] y se suspendieron, seguido de recentrifugado para obtener 2,6 g de las células de expresión. Las células obtenidas se suspendieron en 10 ml de tampón A. Después de que la membrana de *E. coli* se rompiera por sonicación, se centrifugó a 12.000 rpm y a 4°C durante 30 minutos para obtener una fracción soluble que contenía partículas de HBc. El sobrenadante recogido se centrifugó (rotor SW28.2 de Beckman) a 23.000 rpm y a 4°C durante 2 horas para obtener un precipitado. El precipitado se resuspendió en un tampón Tris-EDTA (Tris-HCl 50, pH 8,0, EDTA 5 mM) que contenía sacarosa al 5%. Esto se aplicó a una columna Sepharose CL4B (Amersham Pharmacia Biotech) (2,6 cm x 85 cm) equilibrada con un tampón Tris-EDTA que contenía sacarosa al 5%, y se eluyó con el mismo tampón.

15 Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE, y las fracciones en las que se detectó la banda de peso molecular de 22 kDa del antígeno HBc se recogieron. Después de concentrar las fracciones recogidas mediante ultrafiltración (el peso molecular de exclusión, 50 kDa), el concentrado se dividió en capas en un gradiente de densidad gradual en el que se dividió en capas un tampón Tris-EDTA que contenía sacarosa al 40%, y se centrifugó a 39.000 rpm y a 4°C durante 5 horas (rotor Ty60Ti de Beckman). Después del centrifugado, se extrajeron fracciones secuencialmente del fondo, y se analizaron mediante SDS-PAGE. El antígeno HBc se fraccionó en dos capas de la fracción de alta densidad y la fracción de baja densidad, cada una de las cuales se recogió y se usó como antígeno HBc purificado

25 (C) Construcción de un plásmido de expresión para el antígeno de fusión HBe-HBc

Posteriormente se construyó un plásmido para el antígeno de fusión HBe-HBc. Cinco μl de la solución de ADN del VHB preparada a partir del suero anterior de pacientes con VHB se sometieron a PCR utilizando dos cebadores (5'-GAATTCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTT-3' (SEC ID No. 8), 5'-GGATCCTAACATTGAGATTCCTCCGAGA-3' (SEC ID No. 7)). La PCR se realizó utilizando el GeneAmp™ (Kit de Reactivos de Amplificación de ADN, fabricado por Perkin Elmer Cetus) en condiciones de desnaturalización de ADN a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 1 minuto, y síntesis de ADN a 72°C durante 1 minuto, y los fragmentos obtenidos se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y se purificaron mediante el método de polvo de vidrio (GeneClean). El fragmento génico de HBe-HBc amplificado (0,5 μg) se digirió en 20 μl de una solución de enzima de restricción [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl_2 10 mM, ditiotreitól 1 mM, NaCl 100 mM, 15 unidades de EcoRI y 15 unidades de enzimas BamHI) a 37°C durante 1 hora, y a continuación se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para purificar un fragmento EcoRI-BamHI de aproximadamente 600 pb.

40 A continuación, 0,5 μg de ADN de pATtrpE, un vector de expresión, se digirieron en 20 μl de una solución de enzima de restricción [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl_2 10 mM, ditiotreitól 1 mM, NaCl 100 mM, 15 unidades de EcoRI y 15 unidades de enzimas BamHI) a 37°C durante 1 hora, y 39 μl de agua se añadieron a la mezcla de reacción, que a continuación se trató con calor a 70°C durante 5 minutos, y se le añadió 1 μl de una fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) (250 unidades/ μl) y se incubó a 37°C durante 1 hora.

45 Añadiendo fenol a la mezcla de reacción, se realizó la extracción con fenol, y la fase acuosa obtenida se precipitó con etanol, y el precipitado se secó. A 0,5 μg del ADN del vector tratado con EcoRI-BamHI obtenido, el antígeno de fusión HBc-HBe de 600 pb mencionado anteriormente, 5 μl de un tampón de ligasa 10 x [Tris-HCl 660 mM, pH 7,5, MgCl_2 66 mM, ditiotreitól 100 mM, ATP 1 mM] y 1 μl de ligasa T4 (350 unidades/ μl), se les añadió agua para preparar 50 μl , se incubaron durante una noche a 16°C para realizar una reacción de ligamiento. Para obtener un plásmido de expresión pATtrpE-HBe-HBc, esta reacción de ligamiento se utilizó para transformar *E. coli* HB101.

50 La cepa de *E. coli* sensible utilizada para la transformación puede crearse mediante el método de cloruro cálcico [Mandel, M. y Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53: 159-162 (1970)]. La *E. coli* transformada se sembró en una placa de LB (triptona al 1%, NaCl al 0,5%, agar al 1,5%) que contenía 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina y se incubó durante una noche a 37°C. De la colonia microbiana formada en la placa, se tomó una muestra con un asa de platino, y se transfirió a un medio LB que contenía 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina, y se cultivó a 37°C durante una noche.

60 Se centrifugaron y se recogieron 1,5 ml del cultivo microbiano, y la micropreparación del ADN plasmídico se realizó mediante el método de álcali [Manniaty y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio], 1982]. Un μg del ADN plasmídico obtenido se digirió en 20 μl de una solución de enzima de restricción [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl_2 10 mM, ditiotreitól 1 mM, NaCl 100 mM, 15 unidades de EcoRI y 15 unidades de enzimas BamHI) a 37°C durante 1 hora, y se sometió a electroforesis en gel de agarosa para seleccionar un plásmido de expresión pATtrpE-HBe-HBc que proporciona un fragmento EcoRI-BamHI de aproximadamente 600 pb.

(D) Expresión y purificación de un polipéptido que codifica el antígeno de fusión HBe-HBc

Una cepa de *E. coli* HB101 que porta un plásmido de expresión pATrpe-HBe-HBc se inoculó en 3 ml del medio 2YT (triptona al 1,6%, extracto de levadura al 1%, NaCl al 0,5%) que contenía 50 µg/ml de ampicilina, y se cultivó a 37°C durante 9 horas. Un ml de este cultivo se subcultivó en 100 ml del medio M9-CA (Na₂HPO₄ al 0,6%, KH₂PO₄ al 0,5%, NaCl al 0,5%, NH₄Cl al 0,1%, CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄ 2 mM, casaminoácido al 0,5%, glucosa al 0,2%), y se cultivó a 37°C. Cuando la DO₆₀₀ = 0,3, se añadió ácido indolacético hasta una concentración final de 40 mg/l, y se cultivó adicionalmente durante 16 horas. Este cultivo se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos y las células se recogieron.

A las células, se les añadieron 20 ml de tampón A [Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 30 mM] y se suspendieron, seguido de recentrifugado para obtener 2,6 g de las células de expresión. Las células obtenidas se suspendieron en 10 ml de tampón A. Después de que la membrana de *E. coli* se rompiera por sonicación, se centrifugó para obtener una fracción insoluble que contenía el antígeno de fusión HBe-HBc.

Esta fracción insoluble se disolvió en 3 ml de PBS que contenía urea 8 M, ditiotretol 10 mM y EDTA 1 mM, y se sometió a filtración en gel en presencia de urea 6 M en una columna Sephacryl S300HR. El producto de interés se eluyó al vacío. A 6 ml de la fracción de vacío, se le añadieron 60 mg de SDS y 9 mg de ditiotretol, que a continuación se sometieron a filtración en gel de nuevo en presencia de SDS al 0,1% en una columna Sephacryl S300HR para purificar el antígeno de fusión HBe-HBc hasta cerca de la homogeneidad.

Para este antígeno de fusión HBe-HBc, la proteína se determinó mediante el método BCA, y se utilizó como patrón en la detección de antígenos relacionados con el VHB de las muestras del paciente en el ejemplo 5.

Ejemplo 2. Preparación de un hibridoma

Al polipéptido (HBc) preparado en el método anterior, se le añadió SDS hasta una concentración final del 10%, y se sometió a un tratamiento de desnaturalización a 100°C durante 5 minutos. Este antígeno HBc desnaturalizado se diluyó en tampón fosfato 10 mM, pH 7,3, (PBS) que contenía NaCl 0,15 M hasta una concentración final de 0,2-1,0 mg/ml, y a continuación se mezcló con un volumen igual de adyuvante de Freund, que se administró por vía intraperitoneal a 10-20 µg a ratones BALB/c de 4-6 semanas. Una inmunización de refuerzo se realizó cada 2-4 semanas para un total de cinco veces, y como inmunización final se administraron 10 µg de HBc disuelto en PBS en la vena caudal.

El día 3 después de la inmunización final, el bazo se extrajo de forma aséptica de los ratones, y el bazo se desmigajó con tijeras y una malla metálica a células individuales, y se lavó tres veces con el medio RPMI1640. Después de lavar tres veces la línea celular de mieloma de ratón Sp2/OAg14 en el periodo de crecimiento logarítmico con el medio RPMI1640, dichas células y las células esplénicas se mezclaron a una proporción de recuento celular de 1:5. Después del centrifugado a 200 x g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante. Mientras se mezclaba suavemente la masa de células, un ml del medio RPMI1640 que contenía polietilenglicol al 50% (PEG) 4000 (Merch) se añadió lentamente, y 10 ml del medio RPMI1640 se añadieron adicionalmente para la fusión celular.

Después de eliminar el PEG mediante centrifugado (200 x g, 5 minutos), las células fusionadas se suspendieron en un medio RPMI1640 que contenía suero fetal bovino al 10% e hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT), que se sembró a continuación en una placa de cultivo celular de 96 pocillos. Después, se cultivó durante aproximadamente 10 días para permitir que solamente creciera el hibridoma, se tomó una parte del sobrenadante, y se cribó en busca de pocillos que producen anticuerpo anti-HBc mediante un método ELISA que utilizaba, como antígeno inmovilizado, HBc desnaturalizado previamente con SDS, para obtener un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que tiene reactividad con HBc desnaturalizado. Además, un cribado similar se realizó en presencia de SDS para seleccionar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que tiene la reactividad con HBc desnaturalizado incluso en presencia de SDS.

Para los hibridomas obtenidos, se realizó una única clonación mediante el método de la dilución limitante para establecer hibridomas productores de anticuerpos. Los hibridomas obtenidos se designaron como HB44, HB50, HB61, HB91 y HB114. Cinco hibridomas se depositaron en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology [Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial] el 19 de julio de 2000, con los números de entrada FERM BP-7232, FERM BP-7233, FERM BP-7234, FERM BP-7235 y FERM BP-7236.

Ejemplo 3. Preparación y análisis de anticuerpos monoclonales

Los hibridomas obtenidos mediante el método descrito en el ejemplo 2 se transplantaron a la cavidad abdominal de ratones BALB/c que habían recibido previamente una administración intraperitoneal de pristano, y la ascitis que contenía el anticuerpo monoclonal producido 7-14 días después se recogió. A partir de dichos anticuerpos monoclonales, se separaron fracciones de IgG y se purificaron en una cromatografía de afinidad utilizando una

columna Protein A Sepharose.

Utilizando el kit de determinación del isotipo (Zymed) que utiliza anticuerpo anti-Ig de ratón contra cada isotipo, la (sub)clase de cada anticuerpo monoclonal se identificó. Como resultado, HB44, HB50, HB61, HB91 y HB114 eran todos IgG1 y κ.

De una manera similar al ejemplo 1 se construyeron (HBc(1-183)), mutantes de delección de HBc, Trx-HBc(1-47), Trx-HBc(1-81), TrpE-HBc(1-106) y HBc(1-149). Además, se sintetizaron péptidos parciales de aproximadamente 20 aminoácidos PHB-1 a PHB-19 correspondientes a las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de antígenos relacionados con el núcleo del VHB. Para numerar los aminoácidos, el extremo N-terminal del antígeno HBc se estableció como el 1.

Cada (poli)péptido se inmovilizó en una placa de microvaloración, y los anticuerpos monoclonales obtenidos se examinaron en busca de su reactividad con cada (poli)péptido y se sometieron a análisis de epítotos.

El resultado se muestra en la figura 1. El resultado demostró que, dado que el anticuerpo monoclonal HB44 reacciona con el péptido PHB-5 y no reacciona con ningún otro péptido parcial, se descubrió que era un anticuerpo monoclonal que reconoce la región de los aminoácidos No. 31-49. Análogamente, dado que el anticuerpo monoclonal HB91 reacciona con el péptido PHB-2 y no reacciona con ningún otro péptido parcial, se descubrió que era un anticuerpo monoclonal que reconoce la región de los aminoácidos No. 1-19. Dado que el anticuerpo monoclonal HB61 reacciona con los péptidos PHB-14 y PHB-15 y no reacciona con ningún otro péptido parcial, se descubrió que es un anticuerpo monoclonal que reconoce la región común de los aminoácidos No. 131-140. Dado que el anticuerpo monoclonal HB50 reacciona con los péptidos PHB-16, 17, 18, 19 y las regiones son secuencias repetidas similares, se estimó que reconoce la región de los aminoácidos No. 168-176 que muestra una reacción más potente y que reacciona de forma cruzada con PHB16, 17 que contienen secuencias similares. Dado que el anticuerpo monoclonal HB114 no reacciona con ninguno de los péptidos parciales PHB-1 a 19 o Trx-HBc(1-47), y reacciona con Trx-HBc(1-81) y polipéptidos que tienen una región más amplia que esta, se estimó que reconoce un epítoto conformacional presente en la región de los aminoácidos No. 1-81. Los sitios de reconocimiento de anticuerpos monoclonales respectivos se resumen en la tabla 2.

Según la presente invención, hasta la fecha no se han descrito anticuerpos que reconozcan al epítoto presente en la región de los aminoácidos No. 31-49 (SEC ID NO: 1) y al epítoto conformacional presente en la región de los aminoácidos No. 1-81 (SEC ID NO: 2), y cada uno del anticuerpo monoclonal HB44 y el anticuerpo monoclonal HB114 reconoce a un nuevo epítoto.

Tabla 1

(Poli)péptido	Aminoácido No.	Anticuerpo monoclonal				
		HB44	HB50	HB61	HB91	HB114
PHB-1	-10-9	-	-	NT	-	-
PHB-2	1-19	-	-	NT	+	-
PHB-3	11-30	-	-	NT	-	-
PHB-4	21-40	-	-	NT	-	-
PHB-5	31-49	+	-	NT	-	-
PHB-6	41-60	-	-	NT	-	-
PHB-7	51-70	-	-	NT	-	-
PHB-8	61-80	-	-	NT	-	-
PHB-9	71-90	-	-	NT	-	-
PHB-10	81-100	NT-	-	NT	NT	-
PBH-11	91-110	-	-	-	NT	-
PHB-12	101-120	-	-	-	NT	-
PHB-13	111-128	-	-	-	NT	-
PHB-14	121-140	-	-	+	NT	-
PHB-15	131-149	-	-	+	NT	-
PHB-16	141-159	-	+	-	NT	-
PHB-17	150-167	-	+	-	NT	-
PHB-18	160-176	-	+	-	NT	-
PHB-19	168-183	-	+	-	NT	-
Trx-HBc (1-47)	1-47	NT	-	NT	+	-
Trx-HBc (1-81)	1-81	+	-	-	+	+
TrpE-HBc (1-106)	1-106	+	-	-	+	+
HBc (1-149)	1-149	+	-	+	+	+
HBc (1-183)	1-183	+	+	+	+	+

+: Reaccionó, -: No reaccionó, NT: No se ensayó

Tabla 2

Clon	Subclase	Sitio de reconocimiento estimado (aminoácido No.)
HB44	IgG1	31-49
HB50	IgG1	168-176
HB61	IgG1	131-140
HB91	IgG1	1-19
HB114	IgG1	1-81

Ejemplo 4. Método para detectar y medir el antígeno del núcleo del VHB

5 Los anticuerpos monoclonales anti-antígeno del núcleo del VHB HB44, HB61 y HB114 se diluyeron en NaCl 0,5 M, tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6, hasta una concentración final de 2, 1 y 1 µg/ml, respectivamente, y se suministraron a una placa de microvaloración de 96 pocillos negra (Nunc) a 100 µl/pocillo, y se dejaron reposar a 4°C durante una noche. Después de lavar la placa dos veces en 0,4 ml de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 0,15 M, se le añadió una solución de bloqueo (caseína sódica al 0,5%, sacarosa al 3%, NaCl 150 mM, tampón fosfato 10 mM, pH 7,4), y la placa se dejó reposar adicionalmente a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de eliminar la solución de bloqueo, se secó al vacío.

15 A 50 µl de suero, se les añadieron 25 µl de la solución de tratamiento (SDS al 15%, CHAPS al 3%, bromuro de cetiltrimetilamonio al 1%), que se trataron a 56°C durante 30 minutos, y 50 µl de los mismos se utilizaron como muestra de ensayo.

A los pocillos anteriores, se les añadieron 100 µl del tampón de reacción y 50 µl de las muestras de ensayo, y se hicieron reaccionar durante una noche a temperatura ambiente.

20 Después de lavar cinco veces en 0,4 ml de la solución de lavado (Tween 20 al 0,05%, NaCl 0,15 M, tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,4), un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina (ALP), HB50, se diluyó a 0,5 µg/ml, que se añadió a los pocillos a 100 µl/pocillo, y a continuación se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar seis veces en 0,4 ml de la solución de lavado, se añadieron 100 µl de solución CDP-Star con Emerald II (TROPIS) como sustrato de luminiscencia, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se midió la intensidad de la luminiscencia.

30 El resultado de la medición de 25 casos de sueros de un panel de seroconversión de hepatitis B de BBI se muestra en la tabla 3. Para 10 casos de sueros humanos normales que se midieron simultáneamente, los resultados fueron todos negativos. En 13 de 25 casos de sueros del panel de hepatitis de tipo B, el antígeno del núcleo del VHB era positivo. Aunque nueve casos de PHJ201-04, 05, 06, 07, 08, 12, 13, 17 y 25 fueron positivos para el anticuerpo contra HBe, el antígeno del núcleo del VHB podía medirse.

35 Esto reveló que al construir un sistema de ensayo combinando el anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento con un método de tratamiento de muestras de ensayo, el antígeno del núcleo del VHB puede detectarse y cuantificarse de manera sencilla.

Ejemplo 5. Método para detectar y medir antígenos relacionados con el núcleo del VHB

40 Los anticuerpos monoclonales anti-antígeno del núcleo del VHB, HB44, HB61 y HB114 se diluyeron en NaCl 0,5 M, tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6, hasta una concentración final de 2, 1 y 1 µg/ml, respectivamente, y se suministraron en una placa de microvaloración de 96 pocillos negra (Nunc) a 100 µl/pocillo, y se les dejó reposar a 4°C durante una noche. Después de lavar la placa dos veces en 0,4 ml de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 0,15 M, se le añadió la solución de bloqueo (caseína sódica al 0,5%, sacarosa al 3%, NaCl 150 mM, tampón fosfato 10 mM, pH 7,4), y la placa se dejó reposar adicionalmente a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de eliminar la solución de bloqueo, se secó al vacío.

A 50 µl de suero, se les añadieron 25 µl de la solución de tratamiento (SDS al 15%, Tween 60 al 2%), y se trató a 56°C durante 30 minutos, y 50 µl del mismo se utilizaron como muestra de ensayo.

50 A los pocillos anteriores, se les añadieron 100 µl del tampón de reacción y 50 µl de muestras de ensayo, y cada uno se hizo reaccionar durante una noche a temperatura ambiente.

55 Después de lavar cinco veces en 0,4 ml de la solución de lavado (Tween 20 al 0,05%, NaCl 0,15 M, tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,4), el anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina (ALP), HB91, se diluyó con 0,5 µg/ml, que se añadió a los pocillos a 100 µl/pocillo, y a continuación se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar seis veces en 0,4 ml de la solución de lavado, se añadieron 100 µl de solución CDP-Star con Emerald II (TROPIS) como sustrato de luminiscencia, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se midió la intensidad de la luminiscencia.

Algunas muestras de ensayo se diluyeron sucesivamente 10^2 - 10^7 veces, y a continuación se determinaron de manera similar, y al mismo tiempo se determinaron el antígeno HBe y la cantidad de ADN del VHB mediante el método TMA.

El resultado de la medición de 50 casos de sueros de un panel de hepatitis B es el siguiente. Para 27 casos de sueros humanos normales que se midieron simultáneamente, los resultados fueron todos negativos. En 28 de 29 casos de sueros positivos para ADN del VHB, podían detectarse antígenos relacionados con el núcleo del VHB. Y en 10 de 21 casos de sueros negativos para ADN del VHB, podían detectarse antígenos relacionados con el núcleo del VHB. Por lo tanto, se demostró que, con este método, podía detectarse VHB con más sensibilidad que con el método TMA. El antígeno del núcleo del VHB también podía detectarse en las muestras de ensayo positivas para anticuerpo contra HBe.

El resultado de la medición de 25 casos de sueros de un panel de seroconversión de hepatitis B de BBI se muestra en la tabla 3. Para 10 casos de sueros humanos normales que se midieron simultáneamente, los resultados fueron todos negativos. En 17 de 25 casos de sueros del panel de seroconversión de hepatitis B, los antígenos relacionados con el núcleo del VHB fueron positivos. Aunque seis casos de PHJ201-13, 15, 16, 18, 21 y 25 fueron positivos para el anticuerpo contra HBe y negativos para el antígeno HBe, podían determinarse los antígenos relacionados con el núcleo del VHB.

Cuatro muestras de ensayo de sueros del panel de seroconversión de hepatitis B se diluyeron sucesivamente 10^2 - 10^7 veces, y a continuación antígenos relacionados con el núcleo del VHB, ADN del VHB, y el antígeno HBe se determinaron cada uno, y la sensibilidad se comparó. El resultado se muestra en la tabla 4. Para cada muestra de ensayo de PHJ201-04, 07, 08 y 13, el ADN del VHB podía detectarse en diluciones de 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^4 veces mediante el método TMA, y el antígeno HBe podía detectarse en diluciones de 10^4 , 10^4 , 10^4 y 10^3 veces mediante el método RIA. Por el contrario, el antígeno relacionado con el núcleo del VHB podía detectarse en diluciones de 10^6 , 10^5 , 10^5 y 10^5 veces, y era más sensible que el sistema de ensayo del ADN del VHB y del antígeno HBe en las cuatro muestras de ensayo.

Esto revelaba que al construir un sistema de ensayo combinando el anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento con un método de tratamiento de las muestras de ensayo, el antígeno del núcleo del VHB puede detectarse y cuantificarse de manera sencilla.

Tabla 3

No. de panel	Anticuerpo contra HBc Veredicto	Antígeno del núcleo del VHB		Antígeno HBe		Antígeno HBe		Antígenos relacionados con el núcleo del VHB	
		Intensidad de la luminiscencia	Veredicto	s/co	Veredicto	s/co	Veredicto	Intensidad de la luminiscencia	Veredicto
PHJ201-01	-	383	+	5,7	+	0,5	-	36.260	+
PHJ201-02	-	4.429	+	17,0	+	0,5	-	51.781	+
PHJ201-03	-	39.482	+	73,8	+	0,5	-	702.827	+
PHJ201-04	+	1.009.511	+	107,1	+	0,7	-	1.629.518	+
PHJ201-05	+	307	+	1,0	+	0,6	-	8.078	+
PHJ201-06	+	175	+	1,5	+	0,7	-	16.846	+
PHJ201-07	+	541.733	+	200,0	+	0,3	-	1.757.217	+
PHJ201-08	+	15.583	+	195,8	+	0,3	-	1.415.741	+
PHJ201-09	-	3.443	+	22,3	+	0,6	-	63.189	+
PHJ201-10	+	47	-	0,1	-	0,6	-	49	-
PHJ201-11	-	835	+	3,6	+	0,5	-	9.630	+
PHJ201-12	+	225	+	5,8	+	0,6	-	18.112	+
PHJ201-13	+	141.991	+	0,1	-	779,3	-	1.578.721	+
PHJ201-14	+	77	-	0,3	-	10,8	+	41	-
PHJ201-15	+	93	-	0,2	-	2,1	+	170	+
PHJ201-16	+	77	-	0,2	-	>1169,0	+	190	+
PHJ201-17	+	141	-	0,0	-	1,2	+	64	-
PHJ201-18	+	52	-	0,2	-	>1169,0	+	8.781	+
PHJ201-19	+	59	-	0,2	-	32,0	+	74	-
PHJ201-20	+	54	-	0,1	-	>1169,0	+	91	-
PHJ201-21	+	65	-	0,1	-	26,3	+	128	+
PHJ201-22	+	60	-	0,1	-	>1169,0	+	69	-
PHJ201-23	-	57	-	0,2	-	0,5	-	48	-
PHJ201-24	+	40	-	0,2	-	1,9	+	61	-
PHJ201-25	+	413	+	0,2	-	>1169,0	+	133	+

+: Positivo, -: Negativo

35

Tabla 4

Muestra	Factor de dilución	ADN del VHB Método de TMA LEG/ml	Antígeno HBe Método RIA		Antígenos relacionados con el núcleo del VHB Método EIA	
			COI	Veredicto	Intensidad de la luminiscencia	Veredicto
Suero normal		<3,7	0,4	-	41	-
PHJ201-04	x 10 ⁷	<3,7	0,5	-	55	-
	x 10 ⁶	<3,7	0,7	-	126	+
	x 10 ⁵	4,0	0,9	-	713	+
	x 10 ⁴	4,7	5,3	+	6.055	+
	x 10 ³	5,7	38,0	+	62.898	+
	x 10 ²	6,4	157,5	+	483.609	+
PHJ201-04	x 10 ⁷	<3,7	0,5	-	47	-
	x 10 ⁶	<3,7	0,6	-	58	-
	x 10 ⁵	<3,7	0,7	-	208	+
	x 10 ⁴	3,9	2,0	+	1.488	+
	x 10 ³	5,2	15,4	+	16.122	+
	x 10 ²	5,7	96,5	+	187.123	+
PHJ201-08	x 10 ⁷	<3,7	0,5	-	44	-
	x 10 ⁶	<3,7	0,5	-	51	-
	x 10 ⁵	<3,7	0,5	-	157	+
	x 10 ⁴	<3,7	1,6	+/-	1.018	+
	x 10 ³	3,9	10,5	+	12.657	+
	x 10 ²	5,0	76,1	+	123.958	+
PHJ201-13	x 10 ⁷	<3,7	0,6	-	29	-
	x 10 ⁶	<3,7	0,4	-	62	-
	x 10 ⁵	<3,7	0,6	-	253	+
	x 10 ⁴	4,0	0,6	-	1.435	+
	x 10 ³	4,8	1,0	+/-	14.899	+
	x 10 ²	5,7	1,8	+/-	191.714	+

+: Positivo, +/-: Indeterminado, -: Negativo

Ejemplo 6.

- 5 De manera similar al ejemplo 2, se estableció un hibridoma HB110, y se depositó en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology [Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial] el 7 de junio de 2001, con el número de entrada FERM BP-7624.
- 10 Un anticuerpo monoclonal HB110 se preparó de manera similar al ejemplo 3, y la (sub)clase se identificó y se descubrió que era IgG1, κ.

15 El resultado del análisis de epítipo realizado de manera similar al ejemplo 3 se muestra en la tabla 5. El resultado indicaba que, dado que el anticuerpo monoclonal HB110 reacciona con el péptido PHB-4 y no reacciona con ningún otro péptido parcial, éste es un anticuerpo monoclonal que reconoce la región de los aminoácidos No. 21-40. Los sitios de reconocimiento se muestran en la tabla 6. Hasta la fecha no se han descrito anticuerpos que reconozcan la región (SEC ID NO 9) de los aminoácidos No. 21-40, y el anticuerpo monoclonal HB110 reconoce un nuevo epítipo.

Tabla 5

(Poli)péptido	Aminoácido No.	Anticuerpo monoclonal HB110
PHB-1	-10-9	-
PHB-2	1-19	-
PHB-3	11-30	-
PHB-4	21-40	+
PHB-5	31-49	-
PHB-6	41-60	-
PHB-7	51-70	-
PHB-8	61-80	-
PHB-9	71-90	-
Trx-HBc (1-47)	1-47	+
Trx-HBc (1-81)	1-81	+
TrpE-HBc (1-106)	1-106	+
HBc (1-149)	1-149	+
HBc (1-183)	1-183	+

+: Reaccionó, -: No reaccionó

Tabla 6

Clon	Subclase	Sitio de reconocimiento estimado (aminoácido No.)
HB110	IgG1	21-40

Ejemplo 7. Método para detectar y medir antígenos relacionados con el núcleo del VHB

- 5 De manera similar al ejemplo 5, se determinaron antígenos relacionados con el núcleo del VHB. Sin embargo, como anticuerpo monoclonal marcado con fosfatasa alcalina (AP), se utilizó HB110 además de HB91. Cuatro muestras de ensayo de suero de un panel del paciente de seroconversión de hepatitis B de BBI se diluyeron sucesivamente 10^2 - 10^7 veces, y se determinaron los antígenos relacionados con el núcleo del VHB, el ADN del VHB y el antígeno de HBe, y la sensibilidad se comparó. El resultado se muestra en la tabla 7. Para cada muestra de ensayo de PHJ201-04, 07, 08 y 13, el ADN del VHB podía detectarse en diluciones de 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 veces mediante el método TMA, y el antígeno HBe podía detectarse en diluciones de 10^4 , 10^4 , 10^4 y 10^3 veces mediante el método RIA. Por el contrario, los antígenos relacionados con el antígeno de VHB podían detectarse en diluciones de 10^5 , 10^5 , 10^4 y 10^5 veces, y era más sensible que el sistema de ensayo del ADN del VHB y del antígeno HBe.
- 10
- 15 Esto revelaba que, al construir un sistema de ensayo combinando el anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento con un método de tratamiento de muestras de ensayo, el antígeno del núcleo del VHB puede detectarse y cuantificarse de manera sencilla.

Tabla 7

Muestra	Factor de dilución	ADN del VHB Método de TMA LEG/ml	Antígeno HBe Método RIA		Antígenos relacionados con el núcleo del VHB Método EIA (HB91+HB110)	
			COI	Veredicto	Intensidad de la luminiscencia	Veredicto
Suero normal		<3,7	0,4	-	352	-
PHJ201-04	$\times 10^7$	<3,7	0,5	-	346	-
	$\times 10^6$	<3,7	0,7	-	524	-
	$\times 10^5$	4,0	0,9	-	2.043	+
	$\times 10^4$	4,7	5,3	+	15.271	+
	$\times 10^3$	5,7	38,0	+	135.005	+
	$\times 10^2$	6,4	157,5	+	747.176	+
PHJ201-07	$\times 10^7$	<3,7	0,5	-	336	-
	$\times 10^6$	<3,7	0,6	-	372	-
	$\times 10^5$	<3,7	0,7	-	691	+
	$\times 10^4$	3,9	2,0	+	3.889	+
	$\times 10^3$	5,2	15,4	+	37.724	+
	$\times 10^2$	5,7	96,5	+	317.844	+
PHJ201-08	$\times 10^7$	<3,7	0,5	-	321	-
	$\times 10^6$	<3,7	0,5	-	375	-
	$\times 10^5$	<3,7	0,5	-	628	-
	$\times 10^4$	<3,7	1,6	+/-	2.926	+
	$\times 10^3$	3,9	10,5	+	25.222	+
	$\times 10^2$	5,0	76,1	+	202.371	+
PHJ201-13	$\times 10^7$	<3,7	0,6	-	358	-
	$\times 10^6$	<3,7	0,4	-	401	-
	$\times 10^5$	<3,7	0,6	-	749	+
	$\times 10^4$	4,0	0,6	-	4.444	+
	$\times 10^3$	4,8	1,0	+/-	40.945	+
	$\times 10^2$	5,7	1,8	+/-	315.038	+

+ : Positivo, +/- : Indeterminado, - : Negativo

20

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Advanced Life Science Institute, Inc.
- <120> Método para la detección o la medición de VHB
- 25 <130> J824/PCT
- <160> 9
- <210> 1
- <211> 19
- <212> PRT
- 30 <213> Virus de la hepatitis B
- <223> Secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína relacionada con el núcleo del VHB
- <400> 1

ES 2 374 812 T3

Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu
 1 5 10 15
 His Cys Ser
 19

- <210> 2
- <211> 81
- 5 <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B
- <223> Secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína relacionada con el núcleo del VHB
- <400> 2

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45
 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60
 Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala
 65 70 75 80
 Ser
 81

- 10 <210> 3
- <211> 159
- <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B
- 15 <223> Secuencia de aminoácidos del antígeno HBe
- <400> 3

Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile Asp Pro Tyr
 1 5 10 15
 Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp
 20 25 30
 Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr
 35 40 45
 Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr Ala
 50 55 60
 Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Asn Leu Ala Thr
 65 70 75 80
 Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Glu Leu Val Val
 85 90 95
 Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp
 100 105 110
 Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr
 115 120 125
 Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro
 130 135 140
 Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
 145 150 155 159

<210> 4

ES 2 374 812 T3

<211> 183
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis B
 <223> Secuencia de aminoácidos del antígeno HBc
 <400> 4

5

```

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
  1           5           10           15
Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
           20           25           30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
  35           40           45
Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
  50           55           60
Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala
  65           70           75           80
Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys
           85           90           95
Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
           100           105           110
Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
           115           120           125
Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
  130           135           140
Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr
  145           150           155           160
Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
           165           170           175
Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
           180           183
    
```

<210> 5
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis B
 <223> Antígeno de fusión HBe-HBc
 <400> 5

10

```

Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile Asp Pro Tyr
  1           5           10           15
Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp
           20           25           30
Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr
  35           40           45
Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr Ala
  50           55           60
Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Asn Leu Ala Thr
  65           70           75           80
    
```

15

ES 2 374 812 T3

Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Glu Leu Val Val
 85 90 95
 Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp
 100 105 110
 Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr
 115 120 125
 Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro
 130 135 140
 Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg
 145 150 155 160
 Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg
 165 170 175
 Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln
 180 185 190
 Cys
 193

- 5 <210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
- 10 gaattcatgg acttgaccc gtataaa
 <210> 7
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 7
- 15 ggatcctaac attgagattc ccgaga
 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
- 20 gaattctcca agctgtgcct tgggtggcct
 <210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis B
 <220>
- 35 <223> Secuencia de aminoácidos desde el 21º aminoácido hasta el 40º aminoácido de la proteína relacionada con el núcleo del VHB
 <400> 9
 Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 Leu Tyr Arg Glu
 20

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para medir VHB, método que comprende detectar o cuantificar la presencia de VHB haciendo reaccionar a una muestra de ensayo que contiene VHB con una sonda que reconoce específicamente a un epítipo en los aminoácidos no. 31-49 del polipéptido del núcleo del VHB (HBc) desnaturalizado, cuya secuencia se muestra en la SEC ID NO: 1; en el que partículas de VHB y proteínas relacionadas con el VHB en la muestra de ensayo se desnaturalizan para dejar completamente expuestos a los antígenos HBe y HBc y, cuando anticuerpos para los antígenos HBe y HBc están presentes, dichos anticuerpos están inactivados.
- 10 2. Método, según la reivindicación 1, en el que la sonda es un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma HB44 (FERM BP-7232).
3. Método, según la reivindicación 1, en el que la sonda es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.