

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 630**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)
C12N 15/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/576 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C07K 14/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2005 E 05785966 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 1806363**

54 Título: **Método para detectar el antígeno s del virus de la hepatitis B**

30 Prioridad:

22.09.2004 JP 2004274852

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

08.11.2013

73 Titular/es:

**ADVANCED LIFE SCIENCE INSTITUTE, INC.
(100.0%)
2-10-23, MARUYAMADAI
WAKO-SHI, SAITAMA, 351-0112, JP**

72 Inventor/es:

**MAKI, NOBORU;
FUKUDA, YASUYUKI;
KIMURA, TATSUJI;
ODA, YOKO;
OHUE, CHIHARU y
KUSANO, OSAMU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 428 630 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 el antígeno s del virus de la hepatitis B

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo que reconoce un nuevo epitopo del antígeno s (antígeno HBs) del virus de la hepatitis B (HBV) y a un método *in vitro* para detectar HBV, o el antígeno HBs, utilizando el anticuerpo.

Antecedentes de la técnica

El diagnóstico de una infección vírica se realiza principalmente mediante el método de detectar un virus o un componente relacionado con el virus (proteína o ácido nucleico), o mediante el método de detectar un anticuerpo específico producido por el cuerpo humano tras una infección vírica.

10 Normalmente, la infección por HBV puede conocerse confirmando la presencia del antígeno HBs o el anticuerpo HBc. Como indicador no solo de la infección por HBV sino también del estado clínico de un portador de HBV o el juicio de la prognosis y la eficacia del tratamiento, se mide la cantidad del antígeno e del virus de la hepatitis B (antígeno HBe), un anticuerpo contra el antígeno, o el ADN del HBV (ADN-HBV).

15 Entre los antígenos que constituyen las partículas víricas del HBV (partículas de HBV), el antígeno HBs es una importante proteína de la envuelta constitutiva sobre la superficie de la partícula de HBV infecciosa y está anclada en la bicapa lipídica derivada de hepatocitos en la que la partícula de núcleo que contiene el ADN-HBV está envuelta. En la sangre de un paciente infectado con HBV existen partículas esféricas pequeñas no infecciosas o partículas tubulares formadas por antígenos HBs. Las partículas esféricas pequeñas están presentes de modo más abundante en la sangre, y se observan aproximadamente 100 partículas esféricas pequeñas por cada una o varias
20 partículas de HBV. La mayoría de los agentes de ensayo del antígeno HBs disponibles en el mercado en la actualidad detectan principalmente el antígeno HBs en forma de partículas esféricas pequeñas.

El antígeno HBs es una proteína de membrana que consiste en 226 restos aminoácidos (número de aminoácidos de 1 a 226) y que penetra cuatro veces a través de la bicapa lipídica. Aunque aún no se ha aclarado completamente el modelo de la estructura transmembrana del antígeno HBs, Howard et al. (Howard et al., *Viral Hepatitis and Liver Disease* (editado por Zuckerman A. J., Alan R.), pp. 1094-1101, Liss Inc., Nueva York, 1988) han propuesto que el antígeno HBs está compuesto por una región (lado del lumen del RE), fuera de la bicapa lipídica, que consiste en las posiciones 1 a 11 del extremo N-terminal del antígeno HBs, una región transmembrana hidrófoba que penetra a través de la bicapa lipídica que consiste en las posiciones 12 a 28, una región dentro de la bicapa lipídica que consiste en las posiciones 29 a 80, una región transmembrana hidrófoba que consiste en las posiciones 81 a 97, una
30 región del lumen del RE hidrófila que consiste en las posiciones 98 a 156, y dos regiones transmembrana hidrófobas que consisten en las posiciones 157 a 226 (figura 1).

Un determinante "a" común principal utilizado para la detección del antígeno HBs en métodos convencionales está colocado en las posiciones de los aminoácidos 110 a 156, contenidos en los aminoácidos en las posiciones 98 a 156 localizados en el lado del lumen del RE, es decir, sobre la superficie de la partícula vírica. Se ha indicado que este determinante "a" común consiste en una estructura de orden superior compleja, en la que están presentes al menos cuatro epitopos (Hiroaki Okamoto, "Nippon Rinsho, Bunshi Kan-En Uirusubiyogaku, Kiso-Rinsho-Yobo" (Japanese Clinic, *Molecular Hepatitis Virology, Fundamental-Clinic-Prophylaxis*), Lower Volume, Hepatitis A, B, D, E Viruses, pp. 212-222, publicado el 26 de octubre, 1995).
35

El HBV es un virus de ADN, pero se sabe que el HBV sufre mutaciones comparables a los virus de ARN porque, durante la proliferación vírica, su ADN es replicado en ARN, y a partir de este ARN, el ADN es sintetizado por la transcriptasa inversa. Por consiguiente, se considera que, en un individuo infectado por HBV, aparecen mutantes con diversos tipos de mutaciones. Cuando se aplica un estrés selectivo externo, tal como un anticuerpo neutralizante, al HBV en dicho individuo, aparece el fenómeno por que el cual las cepas de HBV sensibles al estrés disminuyen, mientras que los mutantes resistentes o insensibles al estrés aumentan. Los denominados "mutantes de escape", que están resultando problemáticos en los últimos años, son los mutantes que han sufrido una sustitución, deleción o inserción de un aminoácido o aminoácidos en el determinante "a" común principal, por lo cual están dotados de la capacidad para mantener su infección ya que escapan de los anticuerpos que reconocen al determinante "a" antes de la mutación.
40
45

Un problema asociado con la aparición de mutantes de escape es que estos mutantes pueden mantener una infección persistente puesto que pueden escapar de un anticuerpo inducido mediante la inoculación de una vacuna que emplea el determinante "a" antes de la mutación.
50

Otro problema es que estos mutantes de escape no pueden ser detectados con los métodos de reconocimiento del antígeno HBs convencionales. En general, los mutantes de escape que tienen una mutación sobre el determinante "a" común tiene menor reactividad con un anticuerpo monoclonal frente al determinante "a" común en el HBV de tipo salvaje y, así, un anticuerpo monoclonal contra el determinante "a" común de tipo salvaje, utilizado en los métodos de reconocimiento del antígeno HBs convencionales, no puede descubrir realmente una infección de HBV que se
55

está produciendo. Por ejemplo, se ha indicado que un mutante 145Arg, es decir, el mutante en el que el aminoácido en la posición 145 está cambiado de Gly en el tipo salvaje a Arg, tiene una reactividad significativamente menor con un anticuerpo monoclonal contra el determinante "a" común (Hiroaki Okamoto, "Nippon Rinsho, Bunshi Kan-En Uirusubyogaku, Kiso-Rinsho-Yobo" (Japanese Clinic, Molecular Hepatitis Virology, Fundamental-Clinic-Prophylaxis), Lower Volume, Hepatitis A, B, D, E Viruses, pp. 212-222, publicado el 26 de octubre, 1995). De hecho, se ha indicado que una transfusión de sangre, la cual se había demostrado que era negativa al antígeno HBs en un ensayo de selección de HBV utilizando el reactivo de medición del antígeno HBs convencional, provocó una infección por HBV (Thiers et al., Lancet, ii, 1273-1276, 1988).

En la infección aguda por HBV, aparece un fenómeno indicado en el que un paciente infectado por HBV es positivo al antígeno HBs en una etapa inicial de la infección y luego se convierte en negativo al antígeno HBs y simultáneamente se convierte en positivo al anticuerpo HBs. La razón por la cual el paciente se convierte en positivo al anticuerpo HBs es que se produce un anticuerpo contra el determinante "a" común del antígeno HBs en el cuerpo del paciente. El anticuerpo del paciente contra el determinante "a" común se une a la misma región que en el determinante "a" común reconocido por el anticuerpo monoclonal utilizado en el reactivo de ensayo del antígeno HBs, lo cual conduce a la competición entre ambos anticuerpos y, debido a la competición, la sensibilidad del reactivo de ensayo del antígeno HBs se reduce de modo que se evita la detección del HBV por el reactivo de ensayo.

Descripción de la invención

Problema que resuelve la invención

El reactivo de ensayo del antígeno HBs convencional que emplea un anticuerpo monoclonal contra el determinante "a" común en el HBV de tipo salvaje no puede detectar un mutante de escape que tenga una mutación en el determinante "a" común, y cuando se emplea sangre considerada negativa por este reactivo de ensayo para una transfusión sanguínea, puede provocarse una infección por HBV. Un objeto de la presente invención es desarrollar una sonda capaz de detectar dicho mutante de escape del HBV, y un método para medir el antígeno HBs utilizando la sonda.

Otro objeto de la presente invención es desarrollar una sonda que pueda medir el antígeno HBs sin que lo evite un anticuerpo del paciente contra el determinante "a" común, incluso en una muestra positiva al anticuerpo HBs procedente de un paciente infectado, así como un método para medir el antígeno HBs utilizando la sonda.

Medio para resolver el problema

Los presentes inventores han podido solucionar el problema descrito anteriormente utilizando, como sonda, un anticuerpo que reconoce un epitopo localizado sobre un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1.

Es decir, la presente invención se refiere a una sonda (en lo sucesivo "anticuerpo") que reconoce un epitopo localizado sobre un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que corresponde a las posiciones 26 a 80 en el antígeno s del virus de la hepatitis B, y en particular, a una sonda que reconoce un epitopo localizado sobre un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO:1.

La presente invención también se refiere a un método *in vitro* para detectar el virus de la hepatitis B, o el antígeno s del virus de la hepatitis B, que comprende utilizar la sonda descrita anteriormente.

En esta memoria descriptiva, las posiciones de las secuencias parciales de aminoácidos en el antígeno HBs compuesto por 226 restos aminoácidos se indican asignando el número 1 al resto aminoácido N-terminal del antígeno. En la región S del gen HBC se encuentran los genes Pre-S1, Pre-S2 y S que codifican una proteína S grande compuesta por 389 a 400 restos aminoácidos gobernada por el gen Pre-S1 + gen Pre-S2 + gen S, una proteína mediana compuesta de 281 restos aminoácidos gobernada por el gen Pre-S2 + gen S, y una proteína S pequeña compuesta de 226 restos aminoácidos gobernada por el gen S (Keiji Mitamura, "Nippon Rinsho, Bunshi Kan-En Uirusubyogaku, Kiso-Rinsho-Yobo" (Japanese Clinic, Molecular Hepatitis Virology, Fundamental-Clinic-Prophylaxis), Lower Volume, pp. 13-27, publicado el 26 de octubre, 1995). La expresión "antígeno HBs" utilizada en la presente significa en general la proteína S pequeña, a menos que se indique lo contrario. Sin embargo, el método de detección de la presente invención puede detectar la proteína S grande, la proteína S mediana y la proteína S pequeña y, así, el antígeno s del virus de la hepatitis B (antígeno HBs) detectado mediante el método contiene las tres proteínas anteriores.

La sonda de la presente invención es una sonda capaz de reconocer un epitopo sobre un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1, y generalmente es un anticuerpo policlonal o monoclonal capaz de reconocer específicamente el epitopo. Los ejemplos concretos del anticuerpo son los anticuerpos monoclonales producidos por cualquiera de las cepas de células de hibridoma 1C10, 4A3 y 6G6 depositadas con el n.º de registro FERM ABP-10115, ABP-10116 y ABP-10117 desde el 9 de septiembre, 2004, en International Patent Organism Depository (IPOD), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) en la Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Pref., Japón.

La secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1 se corresponde con una secuencia de aminoácidos en las posiciones 26 a 80 del antígeno HBs, es decir, una región hidrófila presente en el interior de una bicapa lipídica del antígeno HBs. Este epitopo está colocado en el interior de la partícula vírica del HBV, la partícula esférica pequeña o la partícula tubular y, a diferencia de una región colocada en el lado del lumen del RE que contiene el determinante "a" común del antígeno HBs, no está sometida a un estrés selectivo, tal como un anticuerpo neutralizante externo capaz de inducir el mutante de escape. Por consiguiente, una mutación en el anterior epitopo, comparado con el determinante "a" común en el método convencional, apenas sufrirá estrés selectivo, y con el epitopo de la presente invención casi nunca o nunca aparecerá el fenómeno por el cual solo dominan los mutantes específicos de modo que solo aumentan los mutantes que no reaccionan con el reactivo de medición del antígeno HBs.

La sonda ("anticuerpo") de la presente invención, cuando se emplea para detectar el antígeno HBs, apenas sufre interferencia por el anticuerpo del paciente contra el antígeno HBs. Esto es porque probablemente el epitopo reconocido por la sonda de la presente invención está localizado en el interior de la partícula de HBV, la partícula esférica pequeña y la partícula tubular, de modo que, comparado con el determinante "a" común del antígeno HBs, es menos probable que este epitopo actúe como inmunógeno en el cuerpo de un paciente infectado por HBV y, así, se suprime la producción del anticuerpo del paciente contra el epitopo.

Mediante la utilización de la sonda de la presente invención, es por tanto posible detectar, de modo fiable, el antígeno HBs incluso en el mutante de escape que tenga una mutación en el determinante "a" común.

Para detectar el antígeno HBs en una partícula de HBV, una partícula esférica pequeña o una partícula tubular en una muestra con la sonda de la presente invención, un epitopo sobre la secuencia de aminoácidos en las posiciones 26 a 80 en el antígeno HBs, localizado en el interior de una bicapa lipídica o en una partícula esférica o tubular, debe estar en un estado que pueda ponerse en contacto con la sonda.

Otro aspecto de la presente invención es un método para detectar el HBV o el antígeno HBs en una muestra, que comprende añadir a una muestra un desnaturalizante capaz de desnaturalizar una bicapa lipídica o un agregado de proteínas, generalmente un desnaturalizante de proteínas, tal como un tensioactivo, un ion caotrópico, etc., en particular un tensioactivo, para detectar el antígeno HBs en la muestra con la sonda de la invención.

En la presente invención, las partículas de HBV, las partículas esféricas pequeñas y las partículas tubulares se desnaturalizan utilizando el desnaturalizante, por lo cual su región interna que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 26 a 80 en el antígeno HBs, es decir, una región hidrófila presente en el interior de una bicapa lipídica del antígeno HBs, queda expuesta hacia el exterior. El desnaturalizante que puede emplearse en la presente es un desnaturalizante que destruye las bicapas lipídicas de las partículas de HBV y rompe los enlaces (la agregación) entre los antígenos HBs en las partículas esféricas pequeñas y las partículas tubulares, pero no inactiva la sonda de la invención, y generalmente puede utilizarse un tensioactivo, tal como dodecilsulfato de sodio.

La presente invención también proporciona un método para detectar virus de HBV, que comprende utilizar la sonda de la presente invención, un desnaturalizante, y una sonda capaz de reconocer específicamente un antígeno de HBV distinto del antígeno HBs, así como un reactivo para la detección de HBV que tenga dicha constitución, es decir, que comprenda la sonda de la presente invención, un desnaturalizante, y una sonda capaz de reconocer específicamente un antígeno de HBV distinto del antígeno HBs.

Mediante la medición de un antígeno de HBV distinto del antígeno HBs, por ejemplo, el antígeno HBcr (documento WO02/14871) con una sonda utilizada en combinación con la sonda de la presente invención, una muestra de un paciente con HBV que pueda ser considerada erróneamente como negativa a HBV por la detección solo del antígeno HBs, puede ser detectada de modo fiable como positiva a HBV.

Tal como se describió anteriormente, se sabe que el antígeno HBs sufre mutaciones con una frecuencia alta comparable a la de los virus de ARN. Por consiguiente, también existe un antígeno HBs mutante que consiste en una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 26 a 80 en el antígeno HBs.

Sin embargo, incluso un antígeno HBs que tenga esta mutación, si su secuencia de aminoácidos es conocida, puede expresarse en *Escherichia coli* y purificarse según la descripción de esta memoria descriptiva. Se obtiene una sonda dirigida a dicho antígeno HBs mutante purificado y puede utilizarse para detectar el antígeno HBs. Por tanto, en la presente invención, la secuencia que corresponde a la secuencia de aminoácidos en las posiciones 26 a 80 en el antígeno HBs no se limita a una sonda que reconozca un epitopo sobre la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:1 ni al método de detección que emplea dicha sonda.

Efecto de la invención

Mediante la sonda ("anticuerpo") de la presente invención y un método *in vitro* para detectar HBV o el antígeno HBs utilizando la misma, un mutante de escape, etc. que tenga una mutación sobre el determinante "a" común del antígeno HBs, que no puede ser detectado mediante el método de detección del antígeno HBs convencional, puede detectarse de modo muy sensible, con lo cual se determina una infección por HBV de un modo muy fiable. Aunque un anticuerpo del paciente contra el determinante "a" común del antígeno HBs inhiba la detección del antígeno HBs,

la infección por HBV puede determinarse de modo fiable mediante el método de detección de la presente invención.

Aunque aparezca un anticuerpo del paciente que compita con la sonda de la presente invención e inhiba la detección del antígeno HBs, la infección por HBV puede determinarse de modo fiable mediante un pretratamiento con una combinación de un agente acidificante o un agente alcalinizante y un desnaturalizante.

- 5 Mediante la utilización de una combinación de la sonda de la invención y una sonda que reconozca otro antígeno de HBV para medir el antígeno HBs y otro antígeno de HBV simultáneamente, la infección por HBV puede detectarse de un modo más fiable.

Breve descripción del dibujo

La figura 1 muestra una ilustración de la estructura secundaria del antígeno HBs.

10 Mejor modo de realizar la invención

La sonda de la presente invención es un anticuerpo capaz de reconocer específicamente un epitopo sobre un péptido que consiste es una secuencia de aminoácidos que se corresponde con las posiciones 26 a 80 del antígeno HBs, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1, en particular un anticuerpo monoclonal generado contra un antígeno, tal como el anterior péptido o el antígeno HBs.

- 15 Puede prepararse un péptido formado por la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1 mediante la tecnología de genes recombinantes empleando un gen que codifique el péptido, o mediante síntesis química, y estos procedimientos de preparación pueden lograrse utilizando diversos métodos o instrumentos, etc., conocidos per se.

- 20 Puede prepararse un fragmento de un gen que contenga la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 separando los genes del virus del suero de un paciente con HBV y amplificando el gen objetivo mediante PCR. Mediante la utilización de sitios de enzimas de restricción derivados de un conector añadido en el momento de la PCR, o de sitios de enzimas de restricción derivados de un plásmido en el que se ha insertado el fragmento del gen, el gen puede clonarse en un vector de expresión.

- 25 Este vector de expresión se transforma en un hospedante, tal como *Escherichia coli*, y la *Escherichia coli* puede cultivarse para obtener el antígeno HBs (26 a 80) colocado en el interior de una bicapa lipídica. Los métodos para recoger y purificar la proteína objetivo a partir del microorganismo obtenido de esta forma mediante cultivo pueden realizarse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, procedimientos tales como la ruptura de células por sonicación, centrifugación, y diversas técnicas cromatográficas. Es decir, cuando la proteína objetivo es expresada con eficacia mediante el método descrito anteriormente, muchas proteínas forman cuerpos de inclusión en el microorganismo. Utilizando esta característica, los microorganismos se suspenden en un tampón bajo condiciones fisiológicas, tales como disolución salina fisiológica, después las células se rompen mediante sonicación, y el material microbiano roto se centrifuga para recuperar una fracción insoluble. La fracción insoluble recuperada se extrae con urea 6 M y se somete a una filtración en gel para obtener el antígeno trpE-HBs (26 a 80) de alta pureza que después puede utilizarse como inmunógeno.

- 35 La sonda de la presente invención, por ejemplo, el anticuerpo policlonal, puede producirse inmunizando periódicamente un animal, tal como una rata, un conejo, una cabra o una oveja, con el antígeno HBs (26 a 80) mencionado anteriormente o un polipéptido (denominado en la presente en lo sucesivo el presente antígeno) solo, o el presente antígeno se conjuga con BSA, KLH o similares, como una mezcla con un adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund, y después se recoge su suero. Para obtener el anticuerpo policlonal que tenga un sitio de reconocimiento específico, existe un método que emplea, como inmunógeno, un péptido parcial en la región objetivo.

- 40 La producción de un anticuerpo monoclonal mediante un hibridoma es muy conocida. Por ejemplo, un animal, tal como un ratón BALB/c, se inmuniza periódicamente con el presente antígeno solo o su conjugado con BSA, KLH o similares, como una mezcla de este con un adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund. Cuando aumenta la titulación del anticuerpo en sangre, el presente antígeno se administra en una inmunización final a la vena caudal, y el bazo se extirpa de modo aséptico, y las células del bazo se fusionan con células de mieloma de ratón adecuadas para producir hibridomas. Este método puede realizarse mediante el método de Kohler y Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

- 50 El hibridoma obtenido mediante el método descrito anteriormente se cultiva en un medio de cultivo adecuado, y después se selecciona y se clona una célula del hibridoma que produzca un anticuerpo que muestre una reacción específica con el presente antígeno. Para clonar el hibridoma productor de anticuerpo, puede utilizarse no solo la dilución limitante sino también un método de agar blando (Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976). Este hibridoma puede cultivarse en un medio o en la cavidad abdominal de un ratón para producir un anticuerpo monoclonal en el medio o el líquido de ascitis.

- 55 El anticuerpo policlonal en el suero o el anticuerpo monoclonal producido en el medio o en el líquido de ascitis puede purificarse mediante métodos tales como cromatografía en columna sobre proteína A. El anticuerpo policlonal puede

someterse a métodos, tales como cromatografía de afinidad utilizando un antígeno inmovilizado sobre un vehículo, en el que solo el anticuerpo que reacciona con el antígeno específico puede purificarse, y de una manera similar, el anticuerpo que no reacciona con el antígeno específico también puede obtenerse.

5 Además del anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal, pueden producirse moléculas utilizadas como sonda. Por ejemplo, un anticuerpo recombinante se describe en detalle en un informe de Hoogenboon (Trends in Biotechnology, 15:62-70, 1997).

10 El desnaturizante utilizado en la presente invención puede ser cualquier desnaturizante que pueda destruir la estructura de una bicapa lipídica de una partícula de HBV o romper los enlaces (la agregación) entre los antígenos HBs en una partícula esférica pequeña y una partícula tubular formadas por antígenos HBs. Por ejemplo, puede utilizarse urea, un agente acidificante y un agente alcalinizante, y en particular, un tensioactivo resulta eficaz. El tensioactivo incluye un tensioactivo no iónico, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo anfótero y un tensioactivo aniónicos, cualquiera de los cuales puede utilizarse si puede destruir la estructura de una bicapa lipídica. Por ejemplo, los tensioactivos no iónicos, tales como Tween 20 y Nonidet P-40 puede destruir suficientemente la estructura de una bicapa lipídica como para exponer el epitopo en la presente invención, aunque su actividad tensioactiva no sea muy fuerte.

15 Se considera que los tensioactivos aniónicos, tales como SDS y sarcosilo, tienen una fuerte actividad tensioactiva, y estos tensioactivos también puede exponer el epitopo en la presente invención. Un tratamiento con un tensioactivo fuerte puede destruir el epitopo conformacional de la proteína, de modo que un anticuerpo que reconozca el epitopo conformacional no pueda unirse al antígeno en ciertos casos; en este caso, el antígeno puede medirse utilizando una sonda que reconozca el epitopo lineal del antígeno HBs.

20 El desnaturizante desempeña un papel no solo en la liberación eficaz de antígenos HBs presentes en una muestra sino también en facilitar la unión del anticuerpo monoclonal al antígeno HBs.

25 En la presente invención, el uso de una sonda que se une específicamente al antígeno desnaturizado con un tensioactivo, según se describió anteriormente, es particularmente preferible. El anticuerpo utilizado como sonda debe ser una sonda capaz de unirse al epitopo de la invención expuesto y desnaturizado mediante el tratamiento de desnaturización descrito anteriormente.

30 Por ejemplo, cuando se emplea un tensioactivo específico que tenga una fuerte actividad tensioactiva, es necesario seleccionar un anticuerpo monoclonal contra el epitopo expuesto y desnaturizado por el tensioactivo. Por consiguiente, se desea emplear un péptido que consista en los aminoácidos correspondientes a las posiciones 26 a 80 en el antígeno HBs (por ejemplo, un péptido que consista en la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1) sometido previamente a un tratamiento de desnaturización con un tensioactivo, para inmunizar a un animal, y también que el anticuerpo se seleccione utilizando dicho péptido.

35 Para la selección del anticuerpo, el antígeno peptídico sometido a un tratamiento de desnaturización se inmoviliza sobre una fase sólida y se emplea para la selección de un anticuerpo monoclonal que reaccione con el antígeno en una disolución que contenga un tensioactivo, con lo cual puede obtenerse el anticuerpo de la invención adecuado para un inmunoensayo. Puesto que la disolución de selección contiene un tensioactivo, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal resistente a la acción de desnaturización del tensioactivo.

40 El antígeno HBs tratado con desnaturizante en una muestra puede detectarse con inmunoensayos, tales como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo de inmunomanchas de enzimas, un radioinmunoensayo, y un ensayo basado en la aglutinación u otros inmunoensayos muy conocidos. Cuando se emplea un anticuerpo marcado en la detección, se emplea un marcador, tal como una sustancia fluorescente, una sustancia quimioluminiscente, una sustancia radiactiva o una enzima.

45 Por ejemplo, cuando se emplea un método basado en el principio de la reacción de "sandwich" de ELISA para detectar el antígeno HBs en una muestra, el método comprende las siguientes etapas. En primer lugar, un anticuerpo o similar que reconozca el epitopo localizado en el interior de una bicapa lipídica se une a un soporte sólido (por ejemplo, la pared interna de un pocillo de microtitulación). Después, se realiza el bloqueo con albúmina de suero bovina o similar para evitar la reacción no específica. Se añade a este soporte una muestra tratada con un tensioactivo o similar para permitir que el antígeno HBs sea capturado por el anticuerpo inmovilizado sobre él. Un anticuerpo marcado o similar contra el antígeno HBs capturado puede hacerse reaccionar con el antígeno HBs para detectarlo. El anticuerpo que se va a unir al soporte sólido puede ser cualquier anticuerpo que se una al epitopo colocado en el interior de una bicapa lipídica. El anticuerpo marcado puede ser cualquier anticuerpo que se una al antígeno HBs. Su combinación es arbitraria, y puede seleccionarse una combinación que logre una alta sensibilidad y una alta especificidad.

55 El soporte sólido descrito anteriormente que puede utilizarse incluye poliestireno, policarbonato, polipropileno, una placa de microtitulación de polivinilo, un tubo de ensayo, un capilar, esferas (partículas de látex, eritrocitos, compuestos metálicos, etc.), una membrana (liposoma, etc.), y un filtro y similares. La muestra en la que puede medirse el antígeno HBs en la presente invención incluye fluidos corporales biológicos, tales como sangre completa,

plasma, suero, orina, saliva y fluido cerebroespinal, así como tejidos, tales como tejidos hepáticos.

Un método para tratar el antígeno HBs en una muestra en un estado que sea adecuado para la la reacción de unión con la sonda, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal, sin implicar procedimientos complejos, resulta importante en la presente invención. Es decir, es importante que una bicapa lipídica del antígeno HBs contenido en una muestra se solubilice de modo que el epitopo, que en principio no estaba expuesto sobre la superficie de las partículas víricas, se exponga.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la presente invención, pero no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

10 **Ejemplo 1: Expresión y purificación del antígeno trpE-HBs (26 a 80)**

(A) Construcción del plásmido que expresa el antígeno TrpE-HBs (26 a 80)

Se construyó un plásmido de expresión para la región (26 a 80) de HBs mediante el siguiente método. Se mezclaron 100 μ l de suero procedente de un paciente con HBV con 100 μ l de extracto de ADN (10 μ l de Tris-HCl 1 M (pH 8,4), 8 μ l de EDTA 250 mM, 40 μ l de SDS al 10%, 8 μ l de NaCl 5 M, 10 μ l de proteinasa K 20 mg/ml, 1 μ l de ARNt (5 μ g/ μ l), y 23 μ l de agua esterilizada) y se incubaron a 54 °C durante 30 minutos. La muestra se mezcló con 200 μ l de una disolución de fenol/cloroformo (1/1) y después se centrifugó a 15 Krpm durante 5 minutos para producir un sobrenadante, y se añadieron 150 μ l de isopropanol y 7 μ l de NaCl 5 M al sobrenadante y se dejó a -20 °C durante 1 hora. Después de la centrifugación a 15 Krpm a 4 °C durante 5 minutos, los precipitados se enjuagaron con etanol al 70% y después se volvieron a centrifugar a 15 Krpm a 4 °C durante 5 minutos. Los precipitados se secaron al aire y se disolvieron en 20 μ l de agua esterilizada para producir una disolución de ADN-HBV.

Se sometieron 5 μ l de esta disolución de ADN-HBV a PCR con 2 cebadores (es decir, 5'-GAATTCCTCACAAATACCCACAGAGTCTA-3' (SEQ ID NO:2) y 5'-GGATCCTTAAAAACGCCGACAGACATCCAGCG-3' (SEQ ID NO:3)). La PCR se realizó con GeneAmp™ (kit de reactivos de amplificación de ADN fabricado por Perkin Elmer Cetus) bajo unas condiciones de desnaturalización del 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 el fragmento de ADN resultante se separó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se purificó mediante un método de polvo de vidrio (GeneClean). Se digirieron 0,5 μ g de este fragmento del gen HBs (26 a 80) amplificado, con 20 μ l de disolución de reacción de enzimas de restricción 20 μ l (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, ditiotreitolo 1 mM, NaCl 100 mM, enzima EcoRI 15 U, y enzima BamHI 15 U) a 37 °C durante 1 hora, y después se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para purificar un fragmento EcoRI-BamHI de aproximadamente 180 pb.

Después, 0,5 μ g de ADN, es decir, un vector de expresión pATtrpE, se digirieron con 20 μ l de disolución de reacción de enzimas de restricción (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, ditiotreitolo 1 mM, NaCl 100 mM, enzima EcoRI 15 U, y enzima BamHI 15 U) a 37 °C durante 1 hora, y después se añadieron 39 μ l de agua a la disolución de reacción, que después se trató con calor a 70 °C durante 5 minutos, y se añadió 1 μ l (250 U/ μ l) de fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Esta disolución de reacción se sometió a una extracción con fenol, y la fase acuosa resultante se precipitó con etanol, y los precipitados se secaron. Se añadieron 0,5 μ g del ADN del vector tratado con EcoRI-BamHI resultante y el fragmento de HBs (26 a 80) de 180 pb mencionando anteriormente a una mezcla preparada con 1 μ l (350 U/ μ l) de ligasa T4 a 5 μ l de 10x tampón ligasa (Tris-HCl 660 mM (pH 7,5), MgCl₂ 66 mM, ditiotreitolo 100 mM, ATP 1 mM) y después se ajustó a 50 μ l con agua, y después se incubó a 16 °C durante la noche para realizar la reacción de acoplamiento. Para obtener el plásmido de expresión pATtrpE-HBs (26 a 80), esta disolución de reacción de acoplamiento se empleó para transformar a *Escherichia coli* HB101.

La cepa de *Escherichia coli* competente utilizada en la transformación se produce mediante un método de cloruro de calcio (Mandel, M. e Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159-162 (1970)). La *Escherichia coli* transformada se cultivó en una placa LB (triptona al 1%, NaCl al 0,5%, agar al 1,5%) que contenía ampicilina 25 μ g/ml y se incubó durante la noche a 37 °C. Una colonia bacteriana transformada que apareció sobre la placa se trasladó con un asa de platino a un medio LB que contenía ampicilina 25 μ g/ml y se cultivó durante la noche a 37 °C.

Se centrifugaron 1,5 ml del cultivo bacteriano transformado para recoger las bacterias, y se realizó la minipreparación del ADN plasmídico mediante el método de álcalis (Manniaty et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1982)). Se digirió 1 μ g del ADN plasmídico resultante con 20 μ l de disolución de reacción de enzimas de restricción (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, ditiotreitolo 1 mM, NaCl 100 mM, enzima EcoRI 15 U, y enzima BamHI 15 U) a 37 °C durante 1 hora, y después se sometió a una electroforesis en gel de agarosa para separar el plásmido de expresión pATtrpE-HBs (26 a 80) que genera un fragmento EcoRI-BamHI de aproximadamente 180 pb.

55

(B) Expresión y purificación del antígeno TrpE-HBs (26 a 80)

La cepa de *Escherichia coli* HB101 que porta el plásmido de expresión pATrpE-HBs (26 a 80) se inoculó sobre 3 ml de medio 2YT (triptona al 1,6%, extracto de levadura al 1%, NaCl al 0,5%) que contenía ampicilina 50 µg/ml, y después se cultivó a 37 °C durante 9 horas. Se inoculó 1 ml de este cultivo en 100 ml de 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, ácido casamino al 0,5%, glucosa al 0,2%) que contenía ampicilina 50 µg/ml, y después se cultivó a 37 °C. Se añadió ácido indolacrílico a una concentración final de 40 mg/l cuando la DO₆₀₀ alcanzó 0,3, y después se cultivó durante 16 horas más. Este cultivo se centrifugó a 5 Krpm durante 10 minutos para recoger el microorganismo.

El microorganismo se suspendió en 20 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM, NaCl 30 mM) y después se centrifugó de nuevo para producir 2,6 g de microorganismo de expresión. El microorganismo resultante se suspendió en 10 ml de tampón A, y después la membrana de *E. coli* se rompió mediante sonicación, seguido de una centrifugación para producir una fracción insoluble que contenía un antígeno de fusión trpE-HBs (26 a 80).

Esta fracción insoluble se disolvió en 3 ml de PBS que contenía urea 8 M, ditiotreitól 10 mM y EDTA 1 mM, y se sometió a una filtración en gel a través de una columna de Sephacryl S300HR en presencia de urea 6 M, con lo que el antígeno de fusión trpE-HBs (26 a 80) casi alcanzó la homogeneidad.

Ejemplo 2: Preparación del hibridoma

El polipéptido (trpE-HBs (26 a 80)) preparado mediante el método descrito anteriormente se disolvió con urea 6 M y después se diluyó hasta una concentración final de 0,2 a 1,0 mg/ml en tampón fosfato 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M (PBS), después se mezcló con un volumen igual de adyuvante de Freund, y se administró por vía intraperitoneal en una dosis de 10 a 20 µg a un ratón BALB/c de 4 a 6 semanas de edad.

El refuerzo se realizó cada 2 a 4 semanas de la misma manera que la descrita anteriormente, y para la inmunización final se administraron 10 µg de HBs disuelto en PBS a la vena caudal.

A los tres días después de la inmunización final, el bazo se retiró de modo aséptico del ratón, después se cortó en células individuales con unas tijeras y una malla metálica, y se lavó 3 veces con medio RPMI 1640. La cepa de células de mieloma de ratón Sp2/OAg14 en la fase de crecimiento logarítmico se lavó 3 veces con medio RPMI 1640, y las células se mezclaron con las células del bazo a una proporción de 1:5. Después de una centrifugación a 200 x g durante 5 minutos, el sobrenadante se retiró, y se añadió 1 ml de medio RPMI 16740 que contenía polietilenglicol (PEG) 4000 al 50% (Merck) lentamente a la masa celular con un mezclado suave, y después se añadieron 10 ml de medio RPMI 1640 para realizar la fusión de las células.

Las células de fusión resultantes se centrifugaron (200 x g, 5 minutos) para eliminar el PEG y después se suspendieron en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10% e hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT), y se cultivaron sobre una placa de cultivo celular de 96 pocillos. Después de que solo los hibridomas se hicieran proliferar mediante cultivo durante aproximadamente 10 días, se seleccionaron los clones que producían el anticuerpo objetivo mediante el método ELISA para producir hibridomas que producían el anticuerpo monoclonal que tiene la especificidad de reacción deseada.

Los hibridomas resultantes se hicieron monoclonales mediante dilución limitante para establecer hibridomas que producen anticuerpos. Los hibridomas resultantes se denominaron 6G6, 4A3, y 1C10, respectivamente. Estas células de hibridoma está depositadas desde el 9 de septiembre, 2004, en International Patent Organism Depository (IPOD), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japón.

Ejemplo 3: Preparación y análisis del anticuerpo monoclonal

Cada uno de los hibridomas obtenidos mediante el método descrito en el ejemplo 2 se transplantó en la cavidad abdominal de un ratón BALB/c al que previamente se le había administrado pristano, y se obtuvo el anticuerpo monoclonal producido en el líquido de ascitis.

La fracción de IgG que contenía el anticuerpo monoclonal se purificó mediante una cromatografía de afinidad sobre una columna de proteína A-Sepharose.

Los respectivos anticuerpos monoclonales obtenidos se analizaron para determinar su epítipo diana utilizando el antígeno TrpE-HBs (26 a 80) y se sintetizaron péptidos sintéticos que consistían cada uno en 20 aminoácidos basándose en la secuencia derivada de la región HBs, y como resultado se descubrió, tal como se muestra en la tabla 1, que estos anticuerpos monoclonales reconocen un epítipo (número de los aminoácidos: 26 a 80) del antígeno HBs, que está localizado en el interior de una bicapa lipídica.

Tabla 1

Nombre del (poli)péptido	n.º de los aminoácidos	Nombre del anticuerpo monoclonal		
		4A3	6G6	1C10
HBS-1	1-20	-	-	-
HBS-2	11-30	-	-	-
HBS-3	21-40	-	-	-
HBS-4	31-50	+	-	-
HBS-5	41-60	-	+	-
HBS-6	51-70	-	+	+
HBS-7	61-80	-	-	-
HBS-8	71-90	-	-	-
TrpE-HBs (26-80)	26-80	+	+	+

5 Mediante un kit de isotipificación (Zymed) que emplea anticuerpos anti-isotipo Ig de ratón, se identificaron (sub)clases de los respectivos anticuerpos monoclonales. Como resultado, el subtipo de 6G6 y 4A3 era IgG1, κ , y el subtipo de 1C10 era IgG2a, κ , tal como se muestra en la tabla 2.

No existen informes acerca de un anticuerpo que reconozca un epitopo de un antígeno que esté presente en la región de los números de los aminoácidos 31 a 70 en la presente invención, y se descubrió que los anticuerpos monoclonales 6G6, 4A3 y 1C10 reconocen el nuevo epitopo, respectivamente.

Tabla 2

Nombre del clon	Subclase	Sitio de reconocimiento calculado (número de los aminoácidos)
4A3	IgG1, κ	31-50
6G6	IgG1, κ	51-60
1C10	IgG2a, κ	51-70

10

Ejemplo 4: Estudio del método de detección utilizando un tensioactivo

15 El anticuerpo monoclonal anti-antígeno HBs 6G6 se diluyó hasta una concentración final de 6 $\mu\text{g/ml}$ con tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M y después se pipeteó sobre una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) en un volumen de 80 μl por pocillo. La placa se dejó a 4 °C durante la noche y después se lavó dos veces con 0,35 ml de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M, seguido de la adición de 0,35 ml de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3) que contenía caseína-Na al 0,5% (denominado en lo sucesivo disolución de bloqueo) y después se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas.

20 Después de retirar la disolución de bloqueo, se añadieron a cada pocillo 40 μl de tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M, BSA al 1%, y caseína-Na al 0,5%, al cual se le habían añadido diversos tensioactivos a una concentración final del 4% u 8%, y 40 μl de muestra de medición, después se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron 5 veces con 0,35 ml de disolución de lavado, seguido de la adición de 80 μl de anticuerpo monoclonal (5C3) marcado con peroxidasa (POD) y se hizo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada pocillo se lava 6 veces con 0,35 ml de la disolución de lavado, y después de su reacción con 80 μl de una disolución de un sustrato (ortofenilendiamina, denominado en lo sucesivo OPD) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadieron 80 μl de una disolución de ácido sulfúrico 2 N a cada pocillo que después se midió para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 492 nm (DO_{492}), siendo la referencia su absorbancia a una longitud de onda de 630 nm.

25

Los resultados de la medición del suero positivo a HBs con diversos tensioactivos se muestra en la tabla 3. Cuando

se empleó el tampón sin tensioactivo para medir el suero positivo al antígeno HBs no pudo detectarse el antígeno HBs, pero cuando se emplearon los tampones que contenían diversos tipos de tensioactivos (tensioactivos aniónicos, catiónicos, anfóteros y no iónicos) en la medición, pudo obtenerse una señal suficiente para detectar claramente el antígeno HBs. Por tanto, se reveló que puede detectarse un nuevo epitopo presente en el interior de una bicapa lipídica del antígeno HBs exponiendo el epitopo al exterior con diversos tensioactivos.

El anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa, 5C3, es un anticuerpo monoclonal obtenido expresando un antígeno que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones 1 a 226, es decir, el antígeno HBs de longitud completa, y después purificando el antígeno recombinante e inmunizando a un ratón con él. Se confirmó que el anticuerpo 5C3 obtenido de esta manera se une al anterior antígeno HBs recombinante. Sin embargo, cuando se sintetizaron péptidos sintéticos, que consistían cada uno en 20 aminoácidos que se solapan entre sí en 10 aminoácidos, basándose en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 1 a 226 en el antígeno HBs y se estudió su unión al anticuerpo 5C3 mediante el mismo método que en el ejemplo 3, el anticuerpo 5C3 no reaccionó con ninguno de los péptidos sintéticos. Por consiguiente, se considera que el anticuerpo 5C3 no reconoce un epitopo lineal de una secuencia de aminoácidos del antígeno HBs, sino un epitopo conformacional de este.

Tabla 3

Nombre del reactivo	Polaridad	Concentración (%)	Suero negativo	Suero positivo 1	Suero positivo 2
No adición (control)	-	-	0,004	0,005	0,010
C10TAC	catiónico	8	0,008	0,579	0,451
C14TAC	catiónico	8	0,025	2,222	1,466
Cloruro de laurilpiridinio	catiónico	8	0,026	0,145	0,121
Tween 20	no iónico	8	0,006	0,552	0,541
Triton X100	no iónico	8	0,004	0,895	0,629
NP40	no iónico	8	0,005	0,640	0,528
MEGA10	no iónico	8	0,012	1,051	0,738
Brij35	no iónico	8	0,011	1,003	0,811
CHAPS	anfótero	8	0,015	0,053	0,040
C12APS	anfótero	4	0,007	1,523	1,232
Sarcosilo	aniónico	4	0,010	1,990	1,833
SDS	aniónico	4	0,029	1,401	1,198
No adición (control)	-	-	0,014	0,019	0,021
C12TAB	catiónico	4	0,020	0,949	0,689
C14APS	anfótero	4	0,014	2,857	2,911
C16APS	anfótero	4	0,013	2,829	2,870
C18APS	anfótero	4	0,013	2,806	2,698
C8SO3	aniónico	4	0,016	0,740	0,223
C11SO3	aniónico	4	0,048	2,912	2,922
Hexadecilsulfato de sodio	aniónico	4	0,010	0,397	0,139

Ejemplo 5: Medición de una muestra negativa al antígeno HBs

El antígeno HBs en una muestra que es negativa al antígeno HBs pero que se sospecha que está infectada por HBV se midió mediante una modificación del método del ejemplo 4.

5 El anticuerpo monoclonal anti-antígeno HBs 6G6 se diluyó hasta una concentración final de 6 µg/ml con tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M y después se pipeteó sobre una placa de microvaloración de 96 pocillos (Nunc) a un volumen de 100 µl por pocillo. La placa se dejó a 4 °C durante la noche y después se lavó dos veces con 0,35 ml de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M, seguido de la adición de 0,35 ml de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3) que contenía caseína sodio al 0,5% y sacarosa al 3% (disolución de bloqueo) y dejando la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas.

10 Después de retirar la disolución de bloqueo se añadieron a cada pocillo 50 µl de tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 0,15 M, EDTA-2Na 10 mM, proclina al 0,2%, BSA al 1%, caseína sodio al 0,1%, suero de caballo al 3%, suero de ratón al 2% y Brij 35 al 10%, y 50 µl de muestra de medición, se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron 5 veces con 0,35 ml de disolución de lavado, seguido de la adición de 100 µl del anticuerpo monoclonal (5C3) marcado con peroxidasa (POD) y haciendo reaccionar la mezcla a
15 temperatura ambiente durante 30 minutos.

Después de la reacción, cada pocillo se lavó 6 veces con 0,35 ml de la disolución de lavado, y después de su reacción con 100 µl de una disolución de un sustrato (ortofenilendiamina, denominado en lo sucesivo OPD) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió una disolución de ácido sulfúrico 2 N a la muestra, que
20 después se midió para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 492 nm (DO_{492}), siendo la referencia su absorbancia a una longitud de onda de 630 nm.

La muestra utilizada fue una muestra obtenida en IIC Japan; el antígeno HBs y el anticuerpo anti-HBs se midieron mediante el método CLIA de Abbott Laboratories; y el ADN-HBV se midió mediante el método TMA de Gen-Probe Incorporated.

Tabla 4

n.º	ADN- HBV TMA	HBsAg (método de medición de la invención)		HBsAg		HBsAb		HBsAg	HBeAb	HBcAb	HBcAg	
		Media	Consideración	IU/ml	Consideración	IU/ml	Consideración				RLI	Consideración
1	6,1	2,772	+	2,28	+	115,7	+	-	+	+	965.534	+
2	6,7	2,819	+	0,02	-	541,8	+	-	+	+	152.531	+
3	6,6	0,005	-	0,01	-	773,0	+	-	+	+	252.891	+
4	6,8	2,646	+	1,42	+	174,1	+	-	+	+	337.807	+
5	6,4	2,682	+	0,01	-	545,6	+	-	+	+	312.615	+

Las cinco muestras que aparecen en la tabla 4 son positivas a ADN-HBV mediante el método TMA. Las muestras también son positivas al anticuerpo HBs mediante el método CLIA de Abbott Laboratories y se considera que son suero de pacientes infectados por HBV. Sin embargo, las muestras n.º 2, 3 y 5 fueron consideradas negativas mediante el método CLIA de HBsAg de Abbott Laboratories, es decir, el método de medición del antígeno HBs convencional.

Cuando estas tres muestras negativas al antígeno HBs fueron consideradas según el método de la presente invención, el antígeno HBs pudo detectarse en las muestras n.º 2 y 5. La muestra n.º 3, considerada negativa al antígeno HBs mediante el método de medición de la presente invención y el método de medición CLIA de HBsAg de Abbott Laboratories, pudo detectarse mediante el método de medición de HBcrAg, y la medición simultánea del antígeno HBs y el antígeno HBcr es útil para una detección más precisa del antígeno de HBV.

Ejemplo 6

1) Concentración de un agente acidificante

Se añadieron 50 µl de ácido clorhídrico acuoso a diversas concentraciones a 50 µl de una muestra negativa al antígeno de HBV o tres muestras positivas al antígeno de HBV que contienen anticuerpo anti-HBs (n.º 990493, n.º 990640, n.º 990650) y después se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se estudiaron 50 µl de disolución de la mezcla como muestra de medición mediante el siguiente método.

El anticuerpo monoclonal anti-antígeno HBs 6G6 se diluyó hasta una concentración final de 6 µg/ml con tampón fosfato 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M y después se pipeteó sobre una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) a un volumen de 100 µl por pocillo. La placa se dejó incubar a 4 °C durante la noche.

La placa se lavó dos veces con tampón fosfato 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M, seguido de la adición de 350 µl de tampón fosfato 10 mM, pH 7,1, que contenía caseína sodio al 0,5% y se incubó la placa durante 2 horas. Después de retirar la disolución de bloqueo, se añadieron a los respectivos pocillos 100 µl del tampón de reacción que contenía un agente neutralizante y cada una de las diversas muestras de medición obtenidas mediante el método de tratamiento de muestras, se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación, se lavaron 6 veces con 350 µl de tampón fosfato 10 mM, pH 7,3, que contenía Tween 20 al 0,05% (disolución de lavado), seguido de la adición de 100 µl del anticuerpo monoclonal (5C3) marcado con peroxidasa (PDO) y se hace reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada pocillo se lavó 6 veces con la disolución de lavado y después se incubó con 100 µl de una disolución de un sustrato (ortofenilendiamina, denominado en lo sucesivo OPD) durante 30 minutos, y después se añadieron 100 µl de una disolución de ácido sulfúrico 2 N a cada pocillo, que después se midió para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 492 nm (DO₄₉₂), siendo la referencia su absorbancia a una longitud de onda de 630 nm. La concentración de ácido clorhídrico mostrada en la tabla es la concentración durante el tratamiento después de mezclar la muestra con el agente de tratamiento.

Incluso tras la incubación de las muestras positivas al antígeno HBs que contienen anticuerpo anti-HBs (n.º 990493, n.º 990640, n.º 990650) a temperatura ambiente durante 10 minutos con la disolución sin ácido clorhídrico, la actividad del antígeno HBs apenas pudo detectarse. La actividad del antígeno HBs se reconoció a una concentración de ácido clorhídrico desde 0,05 N en el momento del tratamiento, y alcanzó un máximo a una concentración de 0,25 a 1,0 N (tabla 5).

Tabla 5

Concentración de HCl (N)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
	Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
0	0,002	0,002	0,002	0,005
0,05	0,003	0,210	0,045	0,163
0,1	0,003	0,425	0,055	0,223
0,25	0,001	0,565	0,079	0,369
0,5	0,001	0,541	0,097	0,301
0,75	0,000	0,550	0,100	0,393
1	0,003	0,450	0,085	0,333
1,5	0,003	0,550	0,084	0,281

Ejemplo 7

2) Diversos tensioactivos en presencia de un agente acidificante

Se añadieron 30 μ l de cada uno de diversos tensioactivos disueltos en ácido clorhídrico acuoso 1,0 N a 30 μ l de una muestra negativa al antígeno de HBV o muestras positivas al antígeno HBs (n.º 990493, n.º 990640, n.º 990650) y después se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se estudiaron 50 μ l de disolución de la mezcla como muestra de medición mediante el método descrito en 1) (tablas 6 a 9). La concentración de ácido clorhídrico y la concentración de tensioactivo mostradas en las tablas son las concentraciones durante el tratamiento después de mezclar la muestra con el agente de tratamiento.

Tal como se muestra en las tablas 6 a 9, el tensioactivo con el que al menos 1 de las 3 muestras ha mostrado una mayor reactividad que el criterio de valoración de cada muestra se consideró un tensioactivo eficaz. Como resultado, se descubrió que cuando se añaden diversos tensioactivos junto con un agente acidificante, tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, existe un tensioactivo con el que aumenta la inmunorreactividad del antígeno HBs en la muestra positiva al antígeno HBs. El tensioactivo considerado eficaz fue un tensioactivo anfótero o catiónico que tiene, en su molécula, un grupo alquilo de cadena lineal y una amina terciaria o una sal de amonio cuaternario.

También se reconocen como eficaces tensioactivos no iónicos, tales como Triton X100 y Brij 35. Un tensioactivo que tiene un esqueleto esteroide, tal como CHAPS, no muestra mejoras en la reactividad. Además, también se estudiaron tensioactivos aniónicos, tales como SDS y N-lauroilsarcosinato de sodio, y ácido desoxicólico, pero estos presentaron una mala solubilidad en presencia de un agente acidificante, haciendo con ello que su estudio fuera inviable.

Se reconoció un aumento en la sensibilidad de la medición mediante la adición de un tensioactivo anfótero o catiónico que tiene, en su molécula, un grupo alquilo de cadena lineal y una amina terciaria o una sal de amonio cuaternario, a un agente acidificante. Este tensioactivo eficaz en presencia de un agente acidificante en la disolución de tratamiento, cuando se emplea en la disolución de tratamiento sin el agente acidificante, reduce significativamente la sensibilidad de la medición. A partir de lo anterior, la razón para el aumento en la sensibilidad de la medición sería que el anticuerpo anti-HBs, que actúa como un factor que inhibe la detección del antígeno HBs, es inactivado por el agente acidificante, mientras que el epitopo localizado en el interior de una bicapa lipídica del antígeno HBs en una muestra se expone hacia el exterior mediante la adición del tensioactivo, aumentando así significativamente su reactividad con 6G6.

Tabla 6

Catiónico (tipo TAC)

	Concentración (%)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,006	0,541	0,097	0,254
Criterios para valorar el efecto del tensioactivo			0,812	0,146	0,381
Tensioactivo añadido a HCl 0,5 N					
Cloruro de octiltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₇ N(CH ₃) ₃]Cl	0,5	0,014	0,648	0,146	0,268
	1	0,018	0,783	0,194	0,327
	2	0,019	0,898	0,272	0,348
	5	0,012	1,285	0,419	0,624
Cloruro de deciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₉ N(CH ₃) ₃]Cl	0,5	0,020	0,727	0,231	0,288
	1	0,022	0,976	0,346	0,422
	2	0,011	1,232	0,391	0,525
	5	0,004	1,602	0,419	0,675

Cloruro de dodeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₃]Cl	0,5	0,034	0,797	0,261	0,324
	1	0,030	0,941	0,303	0,386
	2	0,024	0,972	0,259	0,415
	5	0,006	0,990	0,234	0,392
Cloruro de tetradeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₃]Cl	0,5	0,029	0,924	0,261	0,357
	1	0,035	1,002	0,306	0,436
	2	0,015	1,032	0,216	0,409
	5	0,005	0,804	0,136	0,281
Cloruro de hexadeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₃) ₃]Cl	0,5	0,032	0,933	0,254	0,425
	1	0,031	0,974	0,271	0,458
	2	0,021	0,977	0,206	0,402
	5	0,005	0,811	0,164	0,279
Cloruro de laurilpiridinio [C ₅ H ₅ NCH ₂ (CH ₂) ₁₀ CH ₃]Cl	0,5	0,021	0,587	0,190	0,228
	1	0,013	0,716	0,236	0,309
	2	0,001	0,896	0,211	0,312
	5	0,001	0,847	0,168	0,249

Tabla 7
Catiónico (tipo TAB)

	Concentración (%)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,013	0,569	0,097	0,286
Criterios para valorar el efecto del tensioactivo			0,854	0,146	0,429
Tensioactivo añadido a HCl 0,5 N					
Bromuro de octiltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₇ N(CH ₃) ₃]Br	0,5	0,019	0,713	0,128	0,301
	1	0,022	0,836	0,165	0,347
	2	0,025	0,968	0,202	0,361
	5	0,012	1,381	0,314	0,639
Bromuro de deciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₉ N(CH ₃) ₃]Br	0,5	0,025	0,788	0,183	0,306
	1	0,026	1,051	0,260	0,462
	2	0,008	1,535	0,320	0,588
	5	0,005	1,784	0,465	0,800

ES 2 428 630 T3

Bromuro de dodeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₃]Br	0,5	0,029	0,938	0,205	0,353
	1	0,037	1,153	0,303	0,445
	2	0,028	1,343	0,309	0,544
	5	0,011	1,402	0,317	0,496
Bromuro de tetradeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₃]Br	0,5	0,034	0,994	0,210	0,366
	1	0,041	1,181	0,284	0,467
	2	0,020	1,272	0,237	0,443
	5	0,007	1,201	0,289	0,443
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₃) ₃]Br	0,5	0,034	1,080	0,208	0,429
	1	0,037	1,196	0,236	0,498
	2	0,037	1,321	0,226	0,472
	5	0,005	1,017	0,179	0,414

Tabla 8

Anfótero

	Concentración (%)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,008	0,533	0,097	0,240
Criterios para valorar el efecto del tensioactivo			0,799	0,146	0,359
Tensioactivo añadido a HCl 0,5 N					
3-[3-(colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propansulfonato	0,5	0,009	0,606	0,115	0,248
	1	0,007	0,635	0,125	0,302
	2	0,001	0,547	0,076	0,246
	5	0,000	0,456	0,040	0,184
N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propansulfonato CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]	0,5	0,013	0,807	0,189	0,379
	1	0,009	1,073	0,246	0,455
	2	0,002	1,296	0,302	0,651
	5	0,000	1,365	0,410	0,695
N-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propansulfonato CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]	0,5	0,012	0,873	0,181	0,386
	1	0,010	1,076	0,245	0,477
	2	0,005	1,267	0,268	0,554
	5	0,000	1,362	0,356	0,558

ES 2 428 630 T3

N-hexadecil-N,N-dimetil-3- amonio-1-propansulfonato CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]	0,5	0,015	1,013	0,209	0,502
	1	0,016	1,233	0,287	0,581
	2	0,014	1,290	0,256	0,575
	5	0,002	1,286	0,276	0,519

Tabla 9
No iónico

	Concentración (%)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,005	0,459	0,070	0,210
Criterios para valorar el efecto del tensioactivo			0,689	0,105	0,315
Tensioactivo añadido a HCl 0,5 N					
Triton X-100	0,5	0,011	0,545	0,117	0,284
	1	0,009	0,675	0,163	0,356
	2	0,007	0,790	0,193	0,344
	5	0,003	0,827	0,201	0,382
Triton X-114	0,5	0,006	0,470	0,112	0,283
	1	0,005	0,554	0,149	0,372
	2	0,003	0,678	0,160	0,370
	5	0,001	0,489	0,118	0,258
Tween 20	0,5	0,009	0,437	0,086	0,251
	1	0,007	0,468	0,110	0,278
	2	0,008	0,647	0,118	0,341
	5	0,007	0,605	0,147	0,307
Tween 80	0,5	0,007	0,339	0,063	0,209
	1	0,007	0,312	0,068	0,220
	2	0,009	0,451	0,051	0,245
	5	0,007	0,498	0,063	0,240
Brij 35	0,5	0,010	0,496	0,076	0,241
	1	0,010	0,526	0,097	0,291
	2	0,011	0,704	0,108	0,374
	5	0,020	0,907	0,173	0,434

Ejemplo 8

3) Desnaturalizante de proteínas en presencia de un agente acidificante

Se añadieron 30 µl de desnaturalizante de proteínas (urea o clorhidrato de guanidina) disueltos en ácido clorhídrico acuoso 1,0 N a 30 µl de una muestra negativa al antígeno de HBV o tres muestras positivas al antígeno HBs (n.º 990493, n.º 990640, n.º 990650) y después se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se estudiaron 50 µl de disolución de la mezcla como muestra de medición mediante el método descrito en 1). La inmunorreactividad de cada muestra positiva al antígeno HBs se muestra en la tabla 10. La concentración de ácido clorhídrico y la concentración de desnaturalizante de proteínas mostradas en la tabla 10 son las concentraciones durante el tratamiento después de mezclar la muestra con el agente de tratamiento.

Las muestras mostraron una mayor inmunorreactividad con el desnaturalizante de proteínas en presencia del agente acidificante que con solo el agente acidificante, es decir, la inmunorreactividad aumentó en aproximadamente 1,5 a 3 veces con urea o en aproximadamente 2 a 3 veces con clorhidrato de guanidina. En el momento del tratamiento con el agente acidificante, las proteínas séricas o similares pueden desnaturalizarse provocando una precipitación o volviéndose turbias en algunos casos, de modo que se dificulta el procedimiento de pipeteo, y los precipitados a menudo son una causa importante para producir resultados falsos positivos. También puede producirse una reducción en la sensibilidad atribuible a la incorporación del antígeno objetivo en estos precipitados. Se reveló que la formación de estos precipitados puede reducirse significativamente añadiendo urea o clorhidrato de guanidina a una concentración de 0,5 M o más en el momento del tratamiento, y este efecto es particularmente mayor si se añade urea a una concentración de 1,5 a 4 M y clorhidrato de guanidina a una concentración de 2 a 3,5 M en el momento del tratamiento.

Tabla 10

	Concentración (M)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,018	0,483	0,076	0,175
Desnaturalizante de proteínas añadido a HCl 0,5 N					
Urea	0,5	0,015	0,555	0,085	0,204
	1	0,010	0,619	0,076	0,236
	1,5	0,006	0,636	0,090	0,248
	2	0,005	0,686	0,081	0,293
	2,5	0,005	0,725	0,100	0,335
	3	0,005	0,771	0,088	0,382
	3,5	0,003	0,830	0,116	0,443
	4	0,008	1,041	0,143	0,578
Guanidina-HCl	0,5	0,027	0,706	0,116	0,235
	1	0,024	0,802	0,146	0,270
	1,5	0,020	0,820	0,140	0,307
	2	0,014	0,943	0,179	0,385
	2,5	0,008	1,039	0,183	0,455
	3	0,005	1,113	0,235	0,504
	3,5	0,003	0,970	0,248	0,528

Ejemplo 9

4) Estudio de un agente reductor en presencia de un agente acidificante

5 Se añadieron 30 μ l de una disolución mixta formada por ditioneitol, clorhidrato de 2-mercaptoetilamina o clorhidrato de 2-dietilaminoetantiool como agentes reductores disueltos en ácido clorhídrico acuoso 1,0 N, a 30 μ l de una muestra negativa al antígeno de HBV (plasma normal) o tres muestras positivas al antígeno HBs (n.º 990493, n.º 990640, n.º 990650) y después se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se estudiaron 50 μ l de disolución de la mezcla como muestra de medición mediante el método descrito en 1) (tabla 11).

10 La concentración del agente reductor utilizada en este caso es su concentración en la muestra durante el tratamiento. Aunque el agente reductor se añadió a la muestra negativa al antígeno de HBV no se reconoció un cambio en su señal, pero en una muestra positiva al antígeno HBs (n.º 990640) se reconoció un aumento del 30% o más con ditioneitol a una concentración de 1 a 5 mM.

Tabla 11
Agente reductor

	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV					
		n.º 990493		n.º 990640		n.º 990650	
		Concentración (mM)	% con relación al control				
Control	Suero de una persona sana	0	0,446	0,073	100	0,159	100
Agente reductor añadido a HCl 0,5 N	Ditioneitol	0,25	0,497	0,080	111	0,177	111
		0,5	0,487	0,083	109	0,184	116
		1	0,500	0,101	112	0,184	116
		2	0,453	0,124	102	0,174	109
		5	0,324	0,116	73	0,092	58
Clorhidrato de 2-mercaptopetilamina	Ditioneitol	10	0,082	0,040	18	0,033	21
		20	0,029	0,011	7	0,023	14
		0,25	0,432	0,056	97	0,154	97
		0,5	0,429	0,064	96	0,144	91
		1	0,426	0,060	96	0,148	93
2	0,411	0,069	92	0,129	81		
5	0,350	0,068	78	0,109	69		
10	0,278	0,075	62	0,074	47		
20	0,217	0,058	49	0,063	40		

50	0,000	0,140	31	0,037	51	0,033	21
0,25	0,015	0,429	96	0,066	90	0,165	104
0,5	0,012	0,429	96	0,067	92	0,156	98
1	0,013	0,456	102	0,066	90	0,166	104
2	0,008	0,436	98	0,083	114	0,151	95
5	0,008	0,397	89	0,081	111	0,129	81
10	0,004	0,298	67	0,085	116	0,090	57
20	0,008	0,259	58	0,079	108	0,078	49
50	0,006	0,145	33	0,065	89	0,049	31

Ejemplo 10

5) Concentración de un agente alcalinizante

Se añadieron 50 μ l de una disolución de hidróxido de sodio acuosa a diversas concentraciones a 50 μ l de una muestra negativa al antígeno de HBV o tres muestras positivas al antígeno de HBV que contienen anticuerpo anti-HBs (n.º 990493, n.º 990640, n.º 990650) y después se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se estudiaron 50 μ l de disolución de la mezcla como muestra de medición mediante el siguiente método de medición.

El anticuerpo monoclonal anti-antígeno HBs 6G6 se diluyó hasta una concentración final de 6 μ g/ml con tampón fosfato 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M y después se pipeteó sobre una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) a un volumen de 100 μ l por pocillo. La placa se dejó incubar a 4 °C durante la noche.

La placa se lavó dos veces con tampón fosfato 10 mM, pH 7,3, que contenía NaCl 0,15 M, seguido de la adición de 350 μ l de tampón fosfato 10 mM, pH 7,1, que contenía caseína sodio al 0,5% y se incubó la placa durante 2 horas. Después de retirar la disolución de bloqueo, se añadieron a cada pocillo 100 μ l del tampón de reacción que contenía un agente neutralizante y las muestras de medición obtenidas mediante cada uno de los métodos de tratamiento de muestras, se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación, y se lavaron 6 veces con 350 μ l de tampón fosfato 10 mM, pH 7,3, que contenía Tween 20 al 0,05% (disolución de lavado), seguido de la adición de 100 μ l de un anticuerpo monoclonal marcado con biotina (HBs124). La mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después cada pocillo se lavó 6 veces con la disolución de lavado y después se añadieron 100 μ l de avidina D marcada con POD, y la mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de que cada pocillo se lavara 6 veces con disolución de lavado se añadieron 100 μ l de una disolución de un sustrato (ortofenilendiamina, denominado en lo sucesivo OPD) y se incubó durante 30 minutos, y después se añadieron 100 μ l de una disolución de ácido sulfúrico 2 N a cada pocillo, que después se midió para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 492 nm (DO_{492}), siendo la referencia su absorbancia a una longitud de onda de 630 nm. La concentración de hidróxido de sodio mostrada en la tabla es la concentración durante el tratamiento después de mezclar la muestra con el agente de tratamiento.

El anticuerpo monoclonal marcado con biotina HBs124 es un anticuerpo monoclonal obtenido expresando y purificando un antígeno HBs de longitud completa (es decir, un antígeno que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 1 a 226) según se describe en el ejemplo 1, e inmunizando un ratón con el antígeno recombinante. Se confirmó que el anticuerpo HBs124 se une al anterior antígeno HBs recombinante. Sin embargo, cuando se sintetizan péptidos sintéticos, que consisten cada uno en 20 aminoácidos que se solapan entre sí en 10 aminoácidos, basándose en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 1 a 226 en el antígeno HBs y se estudia su unión al anticuerpo HBs124 mediante el mismo método que en el ejemplo 3, el anticuerpo HBs124 no reacciona con ninguno de los péptidos sintéticos. Por consiguiente, se considera que el anticuerpo HBs124 no reconoce un epitopo lineal de una secuencia de aminoácidos del antígeno HBs, sino un epitopo conformacional de este.

La actividad del antígeno HBs no puede detectarse incluso mediante la incubación de las muestras positivas a HBV que contienen anticuerpo anti-HBs (n.º 990493, n.º 990640, n.º 990650) en una disolución que no contiene hidróxido de sodio a temperatura ambiente durante 10 minutos, pero se reconoció un aumento en la señal para el antígeno HBs en el tratamiento con hidróxido de sodio a una concentración de 0,25 a 1 N (tabla 12).

Tabla 12

Concentración de NaOH (N)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
	Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
0	0,006	0,005	0,006	0,006
0,05	0,006	0,010	0,004	0,002
0,1	0,010	0,014	0,010	0,008
0,25	0,006	0,034	0,006	0,012
0,5	0,008	0,058	0,006	0,030
0,75	0,004	0,070	0,006	0,039
1	0,010	0,044	0,018	0,042
1,5	0,008	0,012	0,014	0,029

Ejemplo 11

6) Diversas concentraciones de tensioactivo en presencia de un agente alcalinizante

Se añadieron 30 µl de diversos tensioactivos disueltos en una disolución de hidróxido de sodio acuosa 1,0 N a 30 µl de una muestra negativa al antígeno de HBV o tres muestras positivas al antígeno HBs (n.º 990493, n.º 990640, n.º 990650) y después se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se estudiaron 50 µl de disolución de la mezcla como muestra de medición mediante el método descrito en 5) (tablas 13 a 17). La concentración de hidróxido de sodio y la concentración de tensioactivo mostradas en las tablas son las concentraciones durante el tratamiento después de mezclar la muestra con el agente de tratamiento.

Tal como se muestra en las tablas 13 a 17, el tensioactivo con el que al menos 1 de las 3 muestras ha mostrado una mayor reactividad que el criterio de valoración de cada muestra se consideró un tensioactivo eficaz. Como resultado, se descubrió que cuando se añaden diversos tensioactivos junto con un agente alcalizante, tal como hidróxido de sodio, existe un tensioactivo con el que aumenta significativamente la inmunorreactividad del antígeno HBs en la muestra positiva al antígeno HBs. El tensioactivo considerado eficaz incluyen un tensioactivo aniónico, tal como dodecilsulfato de sodio o N-lauroilsarcosina Na, y un tensioactivo anfótero o catiónico que tiene, en su molécula, un grupo alquilo de cadena lineal y una amina terciaria o una sal de amonio cuaternario.

También se reconocen como eficaces tensioactivos no iónicos, tales como Triton X100 y Brij 35, y un tensioactivo que tiene un esqueleto esteroide, tal como CHAPS.

Se reconoció un aumento en la sensibilidad mensurable mediante la adición de un tensioactivo aniónico, o de un tensioactivo anfótero o catiónico que tiene, en su molécula, un grupo alquilo de cadena lineal y una amina terciaria o una sal de amonio cuaternario, a un agente alcalinizante. No se reconoce que este tensioactivo eficaz en presencia de un agente alcalinizante en la disolución de tratamiento, cuando se emplea en la disolución de tratamiento sin el agente alcalinizante, aumente la sensibilidad mensurable. Se consideró que, mediante una combinación del agente alcalizante y el tensioactivo, se inactiva el anticuerpo anti-HBs que actúa como un factor que inhibe la detección del antígeno HBs, y que el epitopo localizado en el interior de una bicapa lipídica del antígeno HBs en una muestra se expone hacia el exterior, aumentando así significativamente su reactividad con 6G6.

Tabla 13

Aniónico

	Concentración (%)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,015	0,032	0,002	0,009
Criterios para valorar el efecto del tensioactivo			0,160	0,010	0,045
Tensioactivo añadido a NaOH 0,5 N					
Dodecilsulfato de sodio CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na	0,5	0,014	0,225	0,137	0,152
	1	0,015	0,340	0,241	0,195
	2	0,016	0,457	0,371	0,308
	5	0,015	0,967	0,430	0,472
Dodecilsulfato de litio CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Li	0,5	0,009	0,239	0,168	0,132
	1	0,015	0,275	0,205	0,141
	2	0,007	0,468	0,416	0,272
	5	0,016	1,055	0,385	0,325
Sal de sodio de N-lauroilsarcosina	0,5	0,008	0,254	0,280	0,143

ES 2 428 630 T3

lauroilsarcosina	1	0,004	0,391	0,354	0,274
	2	0,007	0,540	0,434	0,361
	5	0,007	0,769	0,618	0,482

Tabla 14
Catiónico (tipo TAC)

	Concentración (%)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,021	0,041	0,013	0,021
Criterios para valorar el efecto del tensioactivo			0,205	0,065	0,105
Tensioactivo añadido a HCl 0,5 N					
Cloruro de octiltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₇ N(CH ₃) ₃]Cl	0,5	0,020	0,163	0,120	0,209
	1	0,024	0,277	0,200	0,249
	2	0,021	0,409	0,147	0,167
	5	0,030	0,299	0,032	0,028
Cloruro de deciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₉ N(CH ₃) ₃]Cl	0,5	0,022	0,402	0,287	0,342
	1	0,022	0,418	0,151	0,131
	2	0,018	0,220	0,041	0,031
	5	0,025	0,067	0,023	0,019
Cloruro de dodeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₃]Cl	0,5	0,021	0,513	0,351	0,341
	1	0,013	0,302	0,111	0,075
	2	0,019	0,069	0,028	0,041
	5	0,014	0,029	0,015	0,019
Cloruro de tetradeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₃]Cl	0,5	0,016	0,550	0,402	0,426
	1	0,013	0,359	0,184	0,100
	2	0,016	0,091	0,041	0,029
	5	0,015	0,061	0,017	0,024
Cloruro de hexadeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₃) ₃]Cl	0,5	0,020	0,566	0,326	0,466
	1	0,017	0,418	0,204	0,161
	2	0,021	0,179	0,041	0,036
	5	0,017	0,208	0,023	0,032
Cloruro de laurilpiridinio [C ₅ H ₅ NCH ₂ (CH ₂) ₁₀ CH ₃]Cl	0,5	0,011	0,029	0,043	0,094

ES 2 428 630 T3

[C ₅ H ₅ NCH ₂ (CH ₂) ₁₀ CH ₃]Cl	1	0,010	0,022	0,049	0,062
	2	0,011	0,028	0,030	0,029
	5	0,049	0,043	0,039	0,036

Tabla 15
Catiónico (tipo TAB)

	Concentración (%)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,007	0,031	0,005	0,011
Criterios para valorar el efecto del tensioactivo			0,155	0,025	0,055
Tensioactivo añadido a NaOH 0,5 N					
Bromuro de octiltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₇ N(CH ₃) ₃]Br	0,5	0,008	0,134	0,094	0,180
	1	0,008	0,229	0,173	0,202
	2	0,009	0,403	0,152	0,135
	5	0,011	0,256	0,025	0,019
Bromuro de deciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₉ N(CH ₃) ₃]Br	0,5	0,011	0,385	0,290	0,332
	1	0,015	0,379	0,121	0,068
	2	0,010	0,250	0,025	0,021
	5	0,014	0,037	0,012	0,012
Bromuro de dodeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₃]Br	0,5	0,009	0,521	0,343	0,364
	1	0,007	0,346	0,118	0,063
	2	0,010	0,077	0,023	0,026
	5	0,009	0,041	0,008	0,015
Bromuro de tetradeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₃]Br	0,5	0,008	0,577	0,381	0,438
	1	0,008	0,419	0,190	0,099
	2	0,009	0,109	0,031	0,028
	5	0,010	0,126	0,013	0,017
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio [CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₃) ₃]Br	0,5	0,011	0,611	0,335	0,440
	1	0,011	0,437	0,234	0,183
	2	0,011	0,253	0,079	0,061
	5	0,011	0,067	0,013	0,019

Tabla 16

Anfótero

	Concentración (%)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,008	0,027	0,004	0,010
Criterios para valorar el efecto del tensioactivo			0,135	0,020	0,050
Tensioactivo añadido a NaOH 0,5 N					
3-[3-(colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propansulfonato	0,5	0,006	0,396	0,183	0,200
	1	0,007	0,496	0,201	0,267
	2	0,008	0,660	0,204	0,359
	5	0,007	0,709	0,139	0,290
N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propansulfonato $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_2[(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3]$	0,5	0,010	0,251	0,247	0,122
	1	0,008	0,292	0,288	0,140
	2	0,012	0,330	0,188	0,147
	5	0,006	0,268	0,105	0,119
N-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propansulfonato $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{N}(\text{CH}_3)_2[(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3]$	0,5	0,008	0,339	0,308	0,230
	1	0,007	0,419	0,347	0,187
	2	0,009	0,522	0,357	0,185
	5	0,008	1,037	0,451	0,218
N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propansulfonato $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_2[(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3]$	0,5	0,010	0,370	0,254	0,341
	1	0,008	0,527	0,324	0,278
	2	0,010	0,834	0,551	0,336
	5	0,005	1,110	0,451	0,257

Tabla 17

No iónico

5

	Concentración (%)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,022	0,044	0,013	0,025
Criterios para valorar el efecto del tensioactivo			0,220	0,065	0,125

Tensioactivo añadido a NaOH 0,5 N					
Triton X-100	0,5	0,021	0,305	0,174	0,108
	1	0,021	0,344	0,168	0,121
	2	0,019	0,367	0,185	0,166
	5	0,018	0,299	0,188	0,164
Triton X-114	0,5	0,023	0,293	0,128	0,111
	1	0,023	0,356	0,172	0,190
	2	0,020	0,404	0,173	0,250
	5	0,024	0,528	0,271	0,287
Tween 20	0,5	0,020	0,094	0,033	0,063
	1	0,017	0,215	0,070	0,093
	2	0,021	0,345	0,187	0,250
	5	0,017	0,274	0,117	0,173
Tween 80	0,5	0,017	0,104	0,038	0,081
	1	0,016	0,266	0,116	0,169
	2	0,020	0,379	0,212	0,215
	5	0,015	0,271	0,163	0,141
Brij 35	0,5	0,021	0,317	0,190	0,143
	1	0,016	0,260	0,193	0,150
	2	0,020	0,301	0,255	0,151
	5	0,017	0,365	0,278	0,207

Ejemplo 12

7) Desnaturalizante de proteínas en presencia de un agente alcalinizante

5 Se añadieron 30 μ l de desnaturalizante de proteínas (urea o clorhidrato de guanidina) disueltos en una disolución de hidróxido de sodio acuosa 1,0 N a 30 μ l de una muestra negativa al antígeno HBs o tres muestras positivas al antígeno HBs (n.º 990493, n.º 990640, n.º 990650) y después se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se estudiaron 50 μ l de disolución de la mezcla como muestra de medición mediante el método descrito en 5). La inmunorreactividad de cada muestra positiva al antígeno HBs se muestra en la tabla 18. La concentración de hidróxido de sodio y la concentración de desnaturalizante de proteínas mostradas en la tabla 18 son las 10 concentraciones durante el tratamiento después de mezclar la muestra con el agente de tratamiento.

15 Las tres muestras positivas al antígeno HBs mostraron una mayor inmunorreactividad con el desnaturalizante de proteínas en presencia del agente alcalinizante que con solo el agente alcalinizante, es decir, la inmunorreactividad aumentó en al menos aproximadamente 8 veces con urea o en al menos aproximadamente 4,5 veces con clorhidrato de guanidina. En el caso del tratamiento solo con agente alcalinizante, las proteínas séricas o similares pueden desnaturalizarse en el momento de la neutralización provocando una precipitación o volviéndose turbias en algunos casos, de modo que se dificulta el procedimiento de pipeteo, y los precipitados a menudo son una causa 20 importante para producir resultados falsos positivos. También puede producirse una reducción en la sensibilidad atribuible a la incorporación del antígeno objetivo en estos precipitados. Se reveló que la formación de estos precipitados puede reducirse significativamente añadiendo urea o clorhidrato de guanidina a una concentración de 1 M o más en el momento del tratamiento, y este efecto es particularmente mayor si se añade urea a una concentración de 2 a 4 M y clorhidrato de guanidina a una concentración de 2 a 3 M en el momento del tratamiento.

Tabla 18

	Concentración (M)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,015	0,032	0,002	0,009
Desnaturalizante de proteínas añadido a NaOH 0,5 N					
Urea	1	0,006	0,072	0,017	0,074
	2	0,005	0,168	0,048	0,186
	3	0,007	0,263	0,133	0,305
	4	0,004	0,267	0,179	0,334
Guanidina-HCl	0,5	0,008	0,037	0,017	0,070
	1	0,006	0,052	0,025	0,096
	2	0,006	0,121	0,065	0,147
	3	0,015	0,152	0,111	0,144

Ejemplo 13

8) Estudio de un agente reductor en presencia de un agente alcalinizante

- 5 Se añadieron 30 µl de ditioneol, clorhidrato de 2-mercaptoetilamina, clorhidrato de dietilaminoetanol, 2-mercaptoetanol o clorhidrato de tri(2-carboxietil)fosfina como agentes reductores disueltos en hidróxido de sodio 1,0 N, a 30 µl de una muestra negativa al antígeno de HBV o tres muestras positivas al antígeno HBs (n.º 990493, n.º 990640, n.º 990650) y después se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se estudiaron 50 µl de disolución de la mezcla como muestra de medición mediante el método descrito en 5) (tabla 19).
- 10 La concentración del agente reductor utilizada en este caso es su concentración en la muestra durante el tratamiento. La muestra negativa al antígeno de HBV apenas mostró cambios en la señal, incluso si se añade el agente reductor, pero las tres muestras positivas al antígeno HBs mostraron un aumento en aproximadamente 2 a 3 veces en la señal con clorhidrato de 2-mercaptoetilamina, clorhidrato de dietilaminoetanol y 2-mercaptoetanol a una concentración de 20 mM, respectivamente. El clorhidrato de tri(2-carboxietil)fosfina es más eficaz, con el cual se reconoce un aumento en 1,5 veces en la señal a una concentración de 2 mM, y un aumento en 15 veces o más en la señal a una concentración de 10 mM.
- 15

Tabla 19

Agente reductor

	Concentración (%)	Muestra negativa a HBV	Muestra positiva a HBV		
		Suero de una persona sana	n.º 990493	n.º 990640	n.º 990650
Sin adición	0	0,017	0,053	0,020	0,032
Agente reductor añadido a NaOH 0,5 N					
Ditioneol	2	0,017	0,063	0,023	0,039

ES 2 428 630 T3

	5	0,016	0,058	0,019	0,041
	10	0,019	0,067	0,024	0,051
	20	0,019	0,089	0,025	0,050
Clorhidrato de 2- mercaptoetilamina	2	0,027	0,074	0,028	0,043
	5	0,016	0,066	0,023	0,036
	10	0,017	0,086	0,038	0,058
	20	0,016	0,154	0,078	0,114
Clorhidrato de 2- dietilaminoetantiol	2	0,027	0,066	0,029	0,035
	5	0,023	0,052	0,031	0,043
	10	0,029	0,065	0,067	0,075
	20	0,022	0,094	0,307	0,197
2-mercaptoetanol	2	0,027	0,082	0,033	0,047
	5	0,023	0,084	0,030	0,046
	10	0,025	0,109	0,041	0,058
	20	0,024	0,160	0,064	0,104
Clorhidrato de tri(2- carboxietil)fosfina	2	0,031	0,085	0,036	0,070
	5	0,028	0,141	0,042	0,104
	10	0,066	0,861	0,437	0,689
	20	0,131	0,495	0,534	0,479

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Advances Life Science Institute, INC.

<120> Una secuencia parcial del antígeno s del virus de la hepatitis B

<130> SAP-729-PCT

5 <160> 3

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 55

10 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 1

```

Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe
1             5             10             15
  
```

```

Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr
           20           25           30
  
```

```

Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg
          35           40           45
  
```

```

Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
       50           55
  
```

15 <210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis B

20 <400> 2

gaattcctca caataccaca gagtcta

27

<210> 3

<211> 33

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis B

5 <400> 3

ggatccttaa aaacgccgca gacacatcca gcg

33

REIVINDICACIONES

- 1.- Un anticuerpo que reconoce un epitopo localizado sobre un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que se corresponde con las posiciones 26 a 80 en el antígeno s del virus de la hepatitis B.
- 5 2.- Un anticuerpo que reconoce un epitopo localizado sobre un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
- 3.- El anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, que es capaz de reconocer el antígeno s del virus de la hepatitis B y que puede obtenerse utilizando, como antígeno, un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que se corresponde con las posiciones 26 a 80, o que consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1, en el antígeno s del virus de la hepatitis B desnaturalizado con un desnaturalizante.
- 10 4.- Un método *in vitro* para detectar el virus de la hepatitis B o el antígeno s del virus de la hepatitis B, que comprende utilizar el anticuerpo descrito en cualquier de las reivindicaciones 1 a 3.
- 5.- El método de detección según la reivindicación 4, que se realiza en presencia de un desnaturalizante.
- 6.- El método de detección según la reivindicación 4 o 5, en el que el desnaturalizante es un tensioactivo.
- 15 7.- El método de detección según la reivindicación 4 o 5, en el que la disociación del antígeno s del virus de la hepatitis B y la inactivación de un anticuerpo que se une al antígeno s del virus de la hepatitis B se realizan mediante un tratamiento con un agente de tratamiento que contiene (1) un agente acidificante, y (2) un tensioactivo y/o un desnaturalizante de proteínas como desnaturalizante.
- 20 8.- El método de detección según la reivindicación 4 o 5, en el que la disociación del antígeno s del virus de la hepatitis B y la inactivación de un anticuerpo que se une al antígeno s del virus de la hepatitis B se realizan mediante un tratamiento con un agente de tratamiento que contiene (1) un agente alcalinizante, y (2) un tensioactivo y/o un desnaturalizante de proteínas como desnaturalizante.
- 25 9.- El método de detección según la reivindicación 4 o 5, en el que la disociación del antígeno s del virus de la hepatitis B y la inactivación de un anticuerpo que se une al antígeno s del virus de la hepatitis B se realizan mediante un tratamiento con un agente de tratamiento que contiene (1) un agente alcalinizante, y (2) un tensioactivo y/o un desnaturalizante de proteínas y/o un agente reductor como desnaturalizante.
- 10.- El método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que utiliza también un anticuerpo para un antígeno del virus de la hepatitis B distinto del antígeno s del virus de la hepatitis B.
- 11.- Un reactivo para la detección del antígeno s del virus de la hepatitis B, que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un desnaturalizante.
- 30 12.- Un reactivo para la detección del antígeno s del virus de la hepatitis B, que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un anticuerpo para un antígeno del virus de la hepatitis B distinto del antígeno s del virus de la hepatitis B, y un desnaturalizante.

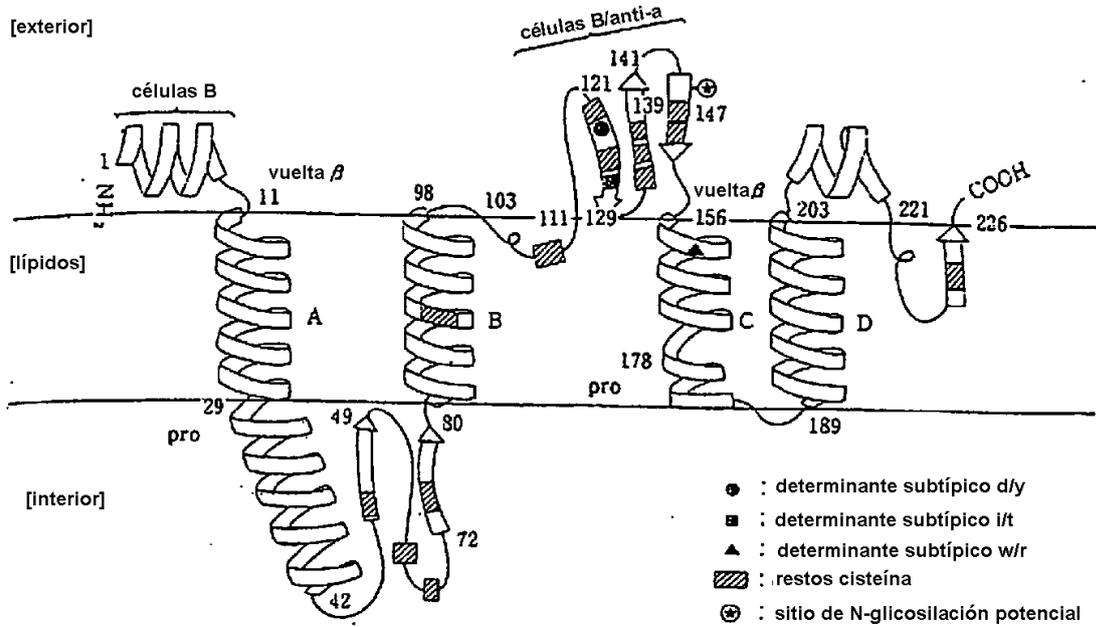


Fig. 1. Estructura secundaria del antígeno HBs (vista de modelo)