

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 849**

51 Int. Cl.:

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2005 E 05857448 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 1766098**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales de conejo a antígenos de superficie de hepatitis B y métodos de utilización de los mismos**

30 Prioridad:

07.06.2004 US 577561 P

28.06.2004 US 583734 P

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

29.08.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
(100.0%)
4560 HORTON STREET
EMERYVILLE, CA 94608, US**

72 Inventor/es:

**CHIEN, DAVID YING;
FONG, YIU-LIAN;
TABRIZI, AZITA;
TODD, HEATHER y
VANCLEVE, MARK DAVID**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 488 849 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

Anticuerpos monoclonales de conejo a antígenos de superficie de hepatitis B y métodos de utilización de los mismos

5

SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere en general al virus de la hepatitis B (VHB). En particular, la invención se refiere a anticuerpos monoclonales de conejo dirigidos contra antígenos de superficie de VHB y métodos de utilización de los mismos para el diagnóstico de infección de VHB.

10

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

El virus de la hepatitis B (VHB) es un miembro de un grupo de virus pequeños que contienen ADN que provocan infecciones no citopáticas persistentes del hígado. La infección por VHB en humanos puede provocar ictericia severa, degeneración hepática y muerte. El VHB entra predominantemente por la ruta parenteral, tiene un periodo característico de incubación de 60 a 160 días, puede persistir en la sangre durante años en portadores crónicos. El VHB es de gran importancia médica debido a que es una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica, tal como carcinoma hepatocelular, en humanos. Los hepatocitos infectados secretan de forma continua partículas virales que se acumulan en altos niveles en la sangre. Además, se estima que aproximadamente del 6 al 7% de la población humana está infectada, con el nivel de infección siendo tan alto como del 20% de la población en ciertas regiones del sudeste asiático y África subsahariana.

15

20

Se han empleado varias pruebas para detectar la presencia de los constituyentes de VHB en suero y otros fluidos corporales. Estas pruebas son predominantemente de principio inmunológico y dependen de la presencia de anticuerpos producidos en humanos o animales para detectar proteínas virales específicas, tales como el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), antígeno de núcleo (nucleocápside) de la hepatitis B (HBcAg) o antígeno "E" de la hepatitis B (HBeAg). Sin embargo, hay una preocupación creciente acerca de la contribución de las variantes con relación a la producción de negativos falsos de HBsAg en ensayos de diagnosis serológica de HBsAg o de cribaje de sangre.

25

30

En particular, el VHB, debido a su modo de replicación por transcripción inversa de su ARN pre-genómico, tiene una alta tasa de mutación respecto a otros virus de ADN. Se han descrito sustituciones de aminoácidos en todas las proteínas virales codificadas por ADN del VHB tales como la polimerasa, HBcAg y HBsAg. La región determinante "a" específica de grupo del VHB (aminoácidos 127-147, numerada con respecto a la porción S de HBsAg) ha atraído la mayor atención, debido a que se han encontrado mutaciones en esta región en el 10-20% de las evasiones de la vacuna y han resultado en el diagnóstico erróneo de las variantes de VHB, aun utilizando los ensayos serológicos más actuales en el mercado. De esta manera, existe la necesidad del desarrollo de pruebas fiables de diagnóstico para detectar el VHB en muestras víricas, con el fin de prevenir la transmisión del virus a través de derivados de sangre y plasma o por contacto personal cercano.

35

40

Se han utilizado hibridomas de conejo-conejo y conejo-ratón en un intento de generar anticuerpos monoclonales con inmunoreactividad incrementada. Véase, por ejemplo, las patentes en Estados Unidos números 4.977.081; 4.859.595; 5.472.868; 5.675.063; Spieker-Polet y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1995) 92:9348-9352. Son deseables anticuerpos monoclonales de conejo por varias razones. Primero, los conejos pueden reconocer antígenos y epítomos que no son inmunogénicos en ratones o ratas, las dos especies a partir de las cuales normalmente se generan los anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, los anticuerpos de conejo en general son de alta afinidad. La patente en Estados Unidos número 4.859.595 describe la producción de anticuerpos monoclonales de conejo contra HBsAg utilizando fusiones de conejo-conejo.

45

50

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de inmunoensayos mejorados que utilicen anticuerpos monoclonales con inmunoreactividad más amplia contra los varios mutantes de HBsAg. Sería altamente deseable la disponibilidad generalizada de reactivos para utilización en un ensayo preciso y eficiente para la infección por VHB.

55

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales altamente inmunorreactivos para el diagnóstico simple, exacto y eficiente de la infección por VHB. Los anticuerpos se producen a partir de hibridomas de conejo y son inmunorreactivos contra varias cepas mutantes de VHB. Por tanto, los métodos de ensayo que utilizan los anticuerpos monoclonales de conejo son más exactos y se reduce el número de falsos negativos vistos con otras pruebas serológicas. Los ensayos que utilizan los anticuerpos permiten por lo tanto la detección de la infección por VHB provocada por una variedad de mutantes del VHB y, si se detecta infección, al individuo se le puede dar el tratamiento apropiado en tiempo adecuado para ayudar a prevenir el daño hepático y la muerte.

60

65

Por consiguiente, en una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal de conejo

anti-VHB que reconoce los mutantes de HBsAg F134A, F134S, G145R, S143L, P142S o Q12 9R/M133T, o un fragmento inmunorreactivo del mismo, tal como un fragmento Fab, F (ab')₂, Fv o un sFv. En realizaciones adicionales, el anticuerpo también reconoce un HBsAg tipo salvaje. Cualquiera de los anticuerpos anteriores se puede producir utilizando un hibridoma de conejo-conejo o un hibridoma de conejo- ratón.

5 En realizaciones adicionales, la invención se refiere a los hibridomas 99S6 (número de acceso ATCC PTA- 6015) y 99S9 (número de acceso ATCC PTA-6014) y anticuerpos producidos por estos hibridomas. En realizaciones adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal de conejo que reconoce el mismo epitopo que un anticuerpo producido por el hibridoma 99S6 y/o 99S9.

10 En realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método para detectar antígenos de superficie del VHB en una muestra biológica. El método comprende:

15 poner en contacto la muestra biológica, como mínimo, con un anticuerpo monoclonal de conejo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, bajo condiciones que permiten que los antígenos del VHB, cuando están presentes en la muestra biológica, se unan al anticuerpo para formar un complejo de anticuerpo/antígeno; y

20 detectar la presencia o ausencia del complejo de anticuerpo/antígeno, detectando de este modo la presencia o ausencia de los antígenos de superficie del VHB en la muestra.

25 En realizaciones preferentes del método anterior, el, como mínimo, un anticuerpo monoclonal de conejo es el anticuerpo producido por el hibridoma 99S6 o el hibridoma 99S9. En ciertas realizaciones, el, como mínimo, un anticuerpo monoclonal de conejo se marca de forma detectable. En ciertas realizaciones, el método además comprende hacer reaccionar la muestra biológica con uno o más anticuerpos adicionales dirigidos contra un HBsAg tipo salvaje o un mutante de HBsAg con una mutación en la región determinante "a". Los uno o más anticuerpos adicionales pueden comprender un anticuerpo monoclonal adicional, tal como un anticuerpo monoclonal de ratón.

30 En realizaciones adicionales, la invención se refiere a un kit de ensayo inmunodiagnóstico para detectar infección por VHB. El kit de ensayo comprende:

35 al menos un anticuerpo monoclonal de conejo, o un fragmento inmunorreactivo del mismo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores; o un soporte sólido que comprende, como mínimo, un anticuerpo monoclonal de conejo o un fragmento inmunorreactivo del mismo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores.

40 En realizaciones preferentes del método anterior, el, como mínimo, un anticuerpo monoclonal de conejo es el anticuerpo producido por el hibridoma 99S6 o el hibridoma 99S9. En ciertas realizaciones, el kit de ensayo además comprende uno o más anticuerpos adicionales dirigidos contra un HBsAg tipo salvaje o un mutante de HBsAg con una mutación en la región determinante "a". Los uno o más anticuerpos adicionales pueden comprender un anticuerpo monoclonal adicional, tal como un anticuerpo monoclonal de conejo.

45 En realizaciones adicionales, la invención se refiere a realizaciones preferentes del soporte sólido, el como mínimo, un anticuerpo monoclonal de conejo es el anticuerpo producido por el hibridoma 99S6 o el hibridoma 99S9. En ciertas realizaciones, el soporte además comprende uno o más anticuerpos adicionales dirigidos contra un HBsAg tipo salvaje o un mutante de HBsAg con una mutación en la región determinante "a". Los uno o más anticuerpos adicionales pueden comprender un anticuerpo monoclonal adicional, tal como un anticuerpo monoclonal de ratón. En realizaciones adicionales, el soporte sólido comprende además, como mínimo, dos controles internos, en los que uno de los controles define el límite de detección inferior para un resultado positivo en un inmunoensayo que utiliza el soporte sólido y el otro control define un resultado altamente positivo en un inmunoensayo que utiliza el soporte sólido. En algunas realizaciones, el soporte sólido es una tira de nitrocelulosa.

50 En una realización adicional, la invención se refiere a un método para detectar la presencia de antígenos de superficie del VHB en una muestra biológica. El método comprende:

55 a) proporcionar una muestra biológica;
 b) proporciona un soporte sólido tal como se ha descrito anteriormente;
 c) poner en contacto la muestra biológica con el soporte sólido, bajo condiciones que permitan que los antígenos de superficie del VHB, si están presentes en la muestra biológica, se unan con, como mínimo, uno de los anticuerpos monoclonales de conejo para formar un complejo de anticuerpo/antígeno; y
 60 (d) detectar la presencia del complejo de anticuerpo/antígeno, detectando de este modo la presencia de los antígenos de superficie del VHB en la muestra biológica.

En ciertas realizaciones, el método comprende además:

65 (e) eliminar los antígenos del VHB no unidos;
 (f) proporcionar uno o más restos capaces de asociarse con el complejo de anticuerpo/antígeno; y

(g) detectar la presencia de los uno o más restos, detectando de este modo la presencia de antígenos de superficie del VHB en la muestra biológica.

5 En realizaciones adicionales del método, los uno o más restos comprenden un anticuerpo contra el VHB marcado de forma detectable, tal como un anticuerpo monoclonal de conejo marcado de forma detectable que reconoce un mutante de HBsAg con una mutación en la región determinante "a", o un fragmento inmunorreactivo del mismo. La marca detectable puede ser una enzima. Adicionalmente, la muestra biológica puede ser de una muestra sanguínea humana.

10 En realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método para detectar la presencia de anticuerpos anti-HBsAg en una muestra biológica. El método comprende:

(a) proporcionar un soporte sólido, tal como se ha descrito anteriormente;

15 (b) poner en contacto el soporte sólido con uno o más HBsAg, bajo condiciones que permitan a los uno o más HBsAg unirse con, como mínimo, uno de los anticuerpos monoclonales de conejo para formar un complejo de anticuerpo/antígeno;

(d) poner en contacto el soporte sólido que tiene el complejo de anticuerpo/antígeno con una muestra biológica, bajo condiciones que permitan que los anticuerpos anti-HBsAg, si están presentes en la muestra biológica, se unan con el complejo de anticuerpo/antígeno para formar un complejo de anticuerpo/antígeno/anticuerpo; y

20 (e) detectar la presencia del complejo de anticuerpo /antígeno/anticuerpo, detectando de este modo la presencia de anticuerpos anti-HBsAg en la muestra biológica.

En realizaciones adicionales, el método comprende además:

(f) eliminar los anticuerpos no unidos;

25 (g) proporcionar uno o más restos capaces de asociarse con el complejo de anticuerpo/antígeno/anticuerpo, tal como uno o más restos que comprenden una molécula de inmunoglobulina de forma detectable marcada; y

(h) detectar la presencia de los uno o más restos, detectando de este modo la presencia de anticuerpos anti-HBsAg en la muestra biológica.

30 En realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método para preparar un suministro sanguíneo que comprende sangre entera, plaquetas, plasma o suero, sustancialmente libre de VHB. El método comprende:

(a) cribar alícuotas de sangre entera, plaquetas, plasma o suero de muestras sanguíneas recolectadas por un método anterior;

35 (b) eliminar cualquiera de las muestras en las que se detecta un antígeno del VHB; y

(c) combinar muestras en las que no se detectan antígenos del VHB para proporcionar un suministro sanguíneo sustancialmente libre de VHB.

40 En realizaciones adicionales, la presente memoria descriptiva describe un método para preparar un suministro sanguíneo que comprende sangre entera, plaquetas, plasma o suero, sustancialmente libres de VHB. El método comprende:

(a) cribar alícuotas de sangre entera, plaquetas, plasma o suero de muestras sanguíneas recolectadas por un método anterior;

45 (b) eliminar cualquier muestra en la que se detecta un anticuerpo anti-HBsAg; y

(c) combinar muestras en las que no se detecta anticuerpo anti-HBsAg para proporcionar un suministro sanguíneo sustancialmente libre de VHB.

50 En aún realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método para cribar un tejido u órgano donado antes del trasplante para proporcionar un tejido u órgano sustancialmente libre de VHB. El método comprende:

(a) cribar una muestra del tejido u órgano por un método anterior;

55 (b) eliminar un tejido u órgano en el que se detecta un antígeno del VHB para proporcionar un tejido u órgano sustancialmente libre de VHB.

En realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método para cribar un tejido u órgano donado antes del trasplante para proporcionar un tejido u órgano sustancialmente libre de VHB. El método comprende:

(a) cribar una muestra del tejido u órgano por un método anterior;

60 (b) eliminar un tejido u órgano en el que se detecta un anticuerpo anti-HBsAg para proporcionar un tejido u órgano sustancialmente libre de VHB.

En aún realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método para preparar un anticuerpo monoclonal de conejo anti-VHB. El método comprende:

65 (a) inmunizar un conejo con un mutante de HBsAg con una mutación en la región determinante "a", en el que el mutante de HbsAg comprende la secuencia de la región determinante "a" de F134A, F134S, G145R, S143L,

P142S o Q129R/M133T;

(b) fusionar células que producen anticuerpos contra el mutante de HBsAg del conejo con una célula de una línea celular inmortalizada para producir un hibridoma;

(c) seleccionar el hibridoma;

5 (d) cultivar el hibridoma seleccionado; y

(e) recolectar el anticuerpo secretado por el hibridoma cultivado.

10 En ciertas realizaciones, el paso de inmunizar comprende inmunizar un conejo con más de un mutante de HBsAg. En ciertas realizaciones, las células productoras de anticuerpo son esplenocitos de conejo. Los esplenocitos se pueden fusionar con una célula de una línea celular inmortalizada de conejo, tal como un plasmacitoma de conejo, para producir un hibridoma de conejo-conejo, o con una célula de una línea celular inmortalizada de ratón, para producir un hibridoma de conejo-ratón.

15 El mutante de HBsAg es un sAg mutante que comprende la secuencia de la región determinante "a" de F134A, F134S, G145R, S143L, P142S o Q129R/M133T. En aún realizaciones adicionales, el conejo se inmuniza con, como mínimo, dos mutantes de HBsAg con diferentes mutaciones en la región determinante "a", tal como con, como mínimo, dos mutantes de HBsAg seleccionados del grupo que comprende F134A, F134S, G145R, S143L, P142S o Q129R/M133T. En realizaciones adicionales, el conejo se inmuniza con los mutantes de HBsAg F134A, F134S, G145R, S143L, P142S y Q129R/M133T. En realizaciones adicionales, el conejo se inmuniza
20 adicionalmente con un HBsAg tipo salvaje.

En realizaciones adicionales, la presente memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal de conejo anti-VHB producido por los métodos anteriores.

25 En aún realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método para preparar un hibridoma de conejo-conejo. El método comprende:

(a) inmunizar un conejo con un mutante de HBsAg con una mutación en la región determinante "a", en el que el mutante de HBsAg comprende la secuencia de la región determinante "a" de F134A, F134S, G145R, S143L, y
30 Q129R/M133T;

(b) fusionar esplenocitos que producen anticuerpos contra el mutante de HBsAg del conejo con células de un plasmacitoma de conejo;

(c) seleccionar células que secreten los anticuerpos.

35 En realizaciones adicionales, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal de conejo o un fragmento inmunorreactivo del mismo tal como un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o sFv, tal como se describe anteriormente.

40 La invención también da a conocer la utilización de un anticuerpo monoclonal de conejo, tal y como se ha descrito anteriormente, en un método de detección de antígenos de superficie del VHB en una muestra biológica. La invención también da a conocer la utilización de un soporte sólido, tal y como se ha descrito anteriormente, en un método de detección de la presencia de antígenos de superficie del VHB y/o anticuerpos HBsAg en una muestra biológica. La invención también da a conocer la utilización de un anticuerpo monoclonal de conejo, tal y como se ha descrito anteriormente, en un método de preparación un suministro de sangre que comprende
45 sangre entera, plaquetas, plasma de suero, sustancialmente libre de VHB. La invención también da a conocer la utilización de un anticuerpo monoclonal de conejo, tal y como se ha descrito anteriormente, en un método de cribado de un tejido u órgano donado antes del trasplante para proporcionar un tejido u órgano sustancialmente libre de VHB.

50 Estas y otras realizaciones de la presente invención serán evidentes para un experto en la materia en vista de la descripción del presente documento.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

55 La figura 1 muestra un esquema del antígeno de superficie del VHB que representa la estructura altamente conformacional de la proteína (panel inferior, línea continua) y la secuencia de aminoácido (SEQ ID NO: 1) alrededor del determinante "a" (desde aa 121-147, panel superior, en círculos). Las flechas indican la posición y sustitución de varias variantes de HBsAg conocidas.

60 Las figuras 2A y 2B (SEQ ID NOS: 2 y 3) muestran la secuencia de aminoácidos para los antígenos adw y ayw tipo salvaje de sAg, respectivamente.

Las figuras 3A-3D muestran las inmunorreactividades de los anticuerpos monoclonales de conejo de 99S6 (figura 3B) y 99S9 (figura 3D), en comparación con los anticuerpos de ratón mMab1 (figura 3C) y mMab2 (figura 3A) contra el panel mutante de VHB descrito anteriormente.

65

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de virología, química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, dentro de la habilidad del experto en la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Fundamental Virology, 3ª Edición, vol. I y II (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds.); Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman y Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Methods in Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

Las siguientes abreviaciones de aminoácidos se utilizan a lo largo de todo el texto:

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
Asparagina: Asn (N)	Ácido aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (c)	Glutamina: Gln (Q)
Ácido glutámico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)
Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile (I)
Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)
Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptófano: Trp (W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

I. DEFINICIONES

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan tal y como se indica a continuación.

Se debe señalar, tal como se utiliza en esta memoria y las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", y "el" o "la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo monoclonal de conejo" incluye una mezcla de dos o más de tales polipéptidos, y similares.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares, se incluyen dentro de la definición. Se abarcan dentro de esta definición proteínas tanto de longitud completa como fragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Adicionalmente, para propósitos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones o sustituciones (en general de naturaleza conservadora), a la secuencia nativa, en tanto que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser intencionadas, tal como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o por errores debidos a la amplificación por PCR.

El término "antígeno" se refiere a un polipéptido, ya sea nativo, recombinante o sintético, que incluye uno o más epítopos que reconocen un anticuerpo. El antígeno en cuestión no necesita incluir la secuencia completa de aminoácidos de la molécula de referencia sino que puede incluir sólo tanto de la molécula como sea necesario para generar una reacción inmunológica (es decir, cuando el antígeno se utiliza para generar anticuerpos) o para reaccionar con el anticuerpo contra el VHB de interés (es decir, en el que el antígeno se está detectando en un ensayo). De esta manera, sólo necesitan estar presentes uno o pocos epítopos de la molécula de referencia. Adicionalmente, el antígeno puede comprender una proteína de fusión entre la molécula de referencia de longitud completa o un fragmento de la molécula de referencia, y otra proteína tal como otro antígeno de VHB y/o una proteína que no perturbe la reactividad del antígeno del VHB. Es fácilmente evidente que el antígeno puede comprender por lo tanto la secuencia de longitud completa, fragmentos, secuencias truncadas y parciales, así como análogos, muteínas y formas precursoras de la molécula de referencia. El término también pretende referirse a deleciones, adiciones y sustituciones a la secuencia de referencia, mientras que el antígeno retenga la capacidad para estimular la producción de anticuerpos y/o para reaccionar con anticuerpos contra el VHB.

A este respecto, la variación natural ocurrirá de aislado a aislado dentro de una cepa particular del VHB. De esta manera, se pretende que el término abarque tal variación y, en particular, un antígeno que varía en su composición de aminoácidos por no más que aproximadamente el 20 por ciento en número, más preferentemente por no más que aproximadamente del 10 al 15 por ciento en número, y de la manera más preferente por no más que aproximadamente el 5 por ciento en número, del antígeno de referencia. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones menores de aminoácidos que no afectan de forma sustancial las capacidades de unión de

anticuerpo del antígeno están, por lo tanto, dentro de la definición del polipéptido de referencia.

Un antígeno "derivado de" una cepa o aislado del VHB se refiere a un antígeno que comprende una secuencia de una o más regiones o porciones de regiones de un antígeno codificado por el genoma de referencia del VHB. Típicamente, el antígeno está compuesto de regiones o porciones de regiones que incluyen epítomos, y generalmente tendrá una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga al polipéptido de referencia, tal como se define a continuación. De esta manera, el término "derivado de" se utiliza para identificar la fuente original de una molécula pero no pretende limitar el método por el que se elabora la molécula que puede ser, por ejemplo, síntesis química o por medios recombinantes.

Los términos "análogo" y "muteína" se refieren a derivados biológicamente activos de la molécula de referencia, que retienen la actividad deseada, tal como inmunorreactividad en ensayos descritos en el presente documento. En general, el término "análogo" se refiere a compuestos que tienen una secuencia y estructura nativa de polipéptido con una o más adiciones, sustituciones (en general de naturaleza conservadora) y/o deleciones de aminoácidos, en relación con la molécula nativa, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad inmunogénica y que sean "sustancialmente homólogas" a la molécula de referencia tal como se define a continuación. Se conocen varias regiones conservadas y variables entre los varios aislados y, en general, la secuencia de aminoácidos de epítomos derivados de estas regiones tendrán un alto grado de homología de secuencia, por ejemplo, homología de secuencia de aminoácidos de más del 50%, generalmente más del 60% - 70%, cuando se alineen las dos secuencias. El término "muteína" se refiere a péptidos que tienen uno o más imitadores de péptidos (por ejemplo, "peptoides"). Preferentemente, el análogo o muteína tiene, como mínimo, la misma inmunorreactividad que la molécula nativa. Métodos para elaborar análogos y muteínas de polipéptido son conocidos en el estado de la técnica y se describen a continuación.

Los términos "análogo" y "muteína" también abarcan mutaciones hechas a propósito que se hacen a la molécula de referencia. Los análogos particularmente preferentes incluyen sustituciones que son de naturaleza conservadora, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Específicamente, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos--aspartato y glutamato; (2) básicos--lisina, arginina, histidina; (3) no polares--alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados--glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina, triptófano y tirosina algunas veces se clasifican como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es predecible de forma razonable que un reemplazo aislado de leucina con isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo conservador similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante en la actividad no biológica. Por ejemplo, el antígeno de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones conservadoras o no conservadoras de aminoácidos o incluso hasta aproximadamente 15-25, 50 ó 75 sustituciones conservadoras o no conservadoras de aminoácidos, o cualquier número entero entre 5-75, en tanto que permanezca intacta la función deseada de la molécula. Un experto en la materia puede determinar fácilmente regiones de la molécula de interés que pueden tolerar cambio por referencia a las gráficas de Hopp/Woods y Kyte-Doolittle, bien conocidas en la técnica.

El término "fragmento de antígeno" se refiere a un antígeno que consiste de sólo una parte de la secuencia y estructura del polipéptido del antígeno intacta de longitud completa. El fragmento puede incluir una deleción C-terminal, una deleción N-terminal, y/o una deleción interna del polipéptido nativo. El término "fragmento inmunogénico" se refiere a un fragmento de un polipéptido que incluye uno o más epítomos y de esta manera produce una o más de las respuestas inmunológicas descritas en el presente documento. Un "fragmento inmunogénico" de una proteína del VHB particular incluirá generalmente, como mínimo, aproximadamente 5-10 residuos contiguos de aminoácidos de la molécula de longitud completa, preferentemente, como mínimo, aproximadamente 15-25 residuos contiguos de aminoácidos de la molécula de longitud completa, y de la forma más preferente, como mínimo, aproximadamente 20-50 o más residuos contiguos de aminoácidos de la molécula de longitud completa, que define un epítomo, o cualquier número entero entre 5 aminoácidos y la secuencia de longitud completa, con la condición de que el fragmento en cuestión mantenga la capacidad para producir una respuesta inmunológica tal como se define en el presente documento.

El término "HBsAg" se refiere a un antígeno de superficie del VHB derivado de cualquiera de las varias cepas y aislados del VHB. El término se refiere a antígenos de superficie que incluyen un dominio S sustancialmente completo de un polipéptido de HBsAg (llamado "sAg" en el presente documento), así como fragmentos inmunogénicos del mismo. Un dominio S de HbsAg está "sustancialmente completo" si contiene la secuencia nativa del polipéptido con o sin deleciones menores de uno o unos pocos aminoácidos de ya sea las regiones N-terminal o C-terminal o dentro del polipéptido. Por ejemplo, el dominio S de HBsAg puede estar truncado por unos pocos aminoácidos, es decir, hasta aproximadamente 3, 5, 7 ó 10 aminoácidos, sin afectar en gran medida a su antigenicidad. Un antígeno de HBsAg para su utilización en el presente documento incluirá generalmente una región que corresponde al determinante "a", localizado en las posiciones 124-147 de aminoácidos, numeradas respecto al sAg. Esta región se describe más adelante de forma adicional. El término también se refiere a un antígeno que incluye el dominio preS2 (anteriormente llamado preS) además del dominio S, o tanto los dominios preS2 como preS1 de HBsAg, además del dominio S. Valenzuela, y otros (1982) Nature

298:347-350, describen el gen para un HbsAg representativo. Véase también Valenzuela, y otros (1979) Nature 280:815-819.

Una molécula "mutante" de HBsAg, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a análogos de HBsAg tipo salvaje, tal como se ha definido anteriormente. Para el propósito de esta invención, el término "HBsAg tipo salvaje" se refiere a los HbsAg de los subtipos ayw y adw. Estos análogos pueden surgir por eventos mutacionales naturales, por ejemplo, en el caso de mutantes de escape, o pueden ser creados a propósito. Las secuencias de HBsAg mutantes representativas se muestran en la figura 1 del presente documento. Se conocen en la técnica, mutantes adicionales que se presentan de forma natural y las secuencias de nucleótidos y las secuencias correspondientes de aminoácidos para los antígenos de superficie de estos mutantes se han depositado en el GenBank. Véase, por ejemplo, números de acceso NCBI AY341335 (mutante de superficie que se presenta de forma natural con múltiples mutaciones en el determinante "a" de sAg), X59795 (mutante del subtipo ayw que se presenta de forma natural); AF01360 y AF013629 (mutantes del subtipo adw que se presentan de forma natural) y Zuckerman y otros 1999 (J. Med Virol. 58:193).

Por secuencias "inmunogénicas" de un HBsAg se quiere decir una molécula de HBsAg que incluye una secuencia de aminoácidos con, como mínimo, un epítipo tal que la molécula es capaz de estimular la producción de anticuerpos en un huésped apropiado. El término "epítipos" se refiere a un sitio de un antígeno al cual responden células B y/o células T específicas, haciendo que el epítipo del VHB en cuestión sea capaz de estimular la producción de anticuerpos. El término también se utiliza de forma intercambiable con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Un epítipo puede comprender 3 o más aminoácidos en una conformación espacial única al epítipo. En general, un epítipo consiste de, como mínimo, 5 de tales aminoácidos y más habitualmente, consiste de, como mínimo, 8-10 aminoácidos o más.

Las regiones de un polipéptido determinado que incluyen un epítipo se pueden identificar utilizando cualquier número de técnicas de mapeo de epítipos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, se pueden determinar epítipos lineales, por ejemplo, sintetizando de forma concurrente grandes números de péptidos en soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos aun están unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en la técnica y se describen por ejemplo en las Patentes en los Estados Unidos No. 4.708.871; Geysen y otros (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81:3998-4002; Geysen y otros (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:178-182; Geysen y otros (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. De manera similar, se identifican fácilmente epítipos conformacionales determinando la conformación espacial de los aminoácidos tal como, por ejemplo, por cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, *supra*. Las regiones antigénicas de las proteínas también se pueden identificar utilizando gráficas de hidropatía y antigenicidad estándar, tales como aquellas calculadas utilizando, por ejemplo, el programa de software Omega versión 1.0 disponible del Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el método de Hopp/Woods, Hopp y otros, Proc. Natl Acad. Sci EE.UU. (1981) 78:3824-3828 para determinar los perfiles de antigenicidad, y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte y otros, J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132 para gráficas de hidropatía.

Una "composición inmunogénica" es una composición que comprende, como mínimo, un polipéptido inmunogénico (por ejemplo, un anticuerpo o antígeno de HBsAg).

"Sustancialmente purificado" se refiere generalmente al aislamiento de una sustancia (compuesto, polinucleótido, proteína, polipéptido, composición de polipéptido) tal que la sustancia comprenda la mayoría del porcentaje de la muestra en la que reside. Típicamente en una muestra, un componente sustancialmente purificado comprende el 50%, preferentemente el 80% - 85%, más preferentemente el 90-95% de la muestra. Son bien conocidas en la técnica las técnicas para purificar polinucleótidos y polipéptidos de interés e incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y sedimentación de acuerdo a la densidad.

El término "aislado", cuando se refiere a un polipéptido, se refiere a que la molécula indicada está separada y discreta del organismo completo con el que la molécula se encuentra en la naturaleza o está presente en la ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "aislado" con respecto a un polinucleótido es una molécula de ácido nucleico desprovista de, en su totalidad o en parte, secuencias normalmente asociadas con la misma en la naturaleza; o una secuencia, tal como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas en asociación con la misma; o una molécula desasociada del cromosoma.

El término "determinante antigénico equivalente" se refiere a un determinante antigénico de diferentes aislados o cepas del VHB, determinantes antigénicos de los cuales no son necesariamente idénticos debido a variación en la secuencia, pero que se presentan en posiciones equivalentes en la secuencia del VHB en cuestión. En general, las secuencias de aminoácidos de los determinantes antigénicos equivalentes tendrán un alto grado de homología de secuencia, por ejemplo, una homología de secuencia de aminoácidos de más del 30%, habitualmente más del 40%, tal como más del 60%, y aun más del 80-90% de homología, cuando se alinean las dos secuencias.

"Homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o dos restos de polipéptido. Dos secuencias de ácido nucleico o dos secuencias de polipéptido son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias muestran, como mínimo, aproximadamente el 50%, preferentemente, como mínimo, aproximadamente el 75%, más preferentemente, como mínimo, aproximadamente el 80% - 85%, preferentemente, como mínimo, aproximadamente el 90%, y de la forma más preferente, como mínimo, aproximadamente el 95% - 98% de identidad de secuencia sobre una longitud definida de las moléculas. Tal como se utiliza en el presente documento, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran identidad completa a la secuencia especificada.

En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta nucleótido-a-nucleótido o aminoácido-a-aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptido, respectivamente. El porcentaje de identidad se puede determinar por una comparación directa de la información de la secuencia entre dos moléculas (la secuencia de referencia y una secuencia con % desconocido de identidad con la secuencia de referencia), alineando las secuencias, contando el número exacto de correspondencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia de referencia, y multiplicando el resultado por 100. Los programas informáticos fácilmente disponibles se pueden utilizar para ayudar en el análisis, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoffed, ed., 5 Supl. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Advances in Appl. Math.: 2:482-489, 1981 para análisis de péptidos. Los programas para determinar la identidad de secuencias de nucleótidos están disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible del Genetics Computer Group, Madison WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también dependen del algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros predeterminados recomendados por el fabricante y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package mencionado anteriormente. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de una secuencia particular de nucleótidos con una secuencia de referencia se puede determinar utilizando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación predeterminada y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Otro método para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es utilizar el paquete de programas MPSRCH propiedad de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). De esta suite de paquetes, el algoritmo de Smith-Waterman se puede emplear en el que se utilizan parámetros predeterminados para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por abertura de hueco de 12, penalización por la extensión del hueco de uno, y un hueco de seis). De los datos generados el valor "Match" refleja la "identidad de secuencia". Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, utilizado con los parámetros predeterminados. Por ejemplo, se pueden utilizar BLASTN y BLASTP utilizando los siguientes parámetros predeterminados: código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; límite = 60; esperado=10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificado por = ALTA PUNTUACIÓN; Base de datos = no redundante, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de CDS del GenBank + Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas están fácilmente disponibles.

Alternativamente, se puede determinar homología por hibridación de los polinucleótidos bajo condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasas específicas de cadena individual y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas se pueden identificar en un experimento de hibridación Southern, por ejemplo, bajo condiciones severas, tal y como se definen para ese sistema particular. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas es conocida por un experto en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook y otros, *supra*; DNA Cloning, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

"Recombinante" tal como se utiliza en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico, se refiere a un polinucleótido de origen genómico, de ADNc, viral, semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociado con todo o una porción del polinucleótido con el que está asociada en la naturaleza. El término "recombinante", tal como se utiliza con respecto a una proteína o polipéptido, se refiere a un polipéptido producido por la expresión de un polinucleótido recombinante. En general, el gen de interés se clona y, a continuación, se expresa en organismos transformados, tal como se describe adicionalmente a continuación. El organismo hospedador expresa el gen extraño para producir la proteína bajo condiciones de expresión.

El término "anticuerpo" se refiere a una molécula que "reconoce", es decir, se une de forma específica a un epitopo de interés presente en un antígeno. El término "se une de forma específica" se refiere a que el anticuerpo interactúa con el epitopo en un tipo de interacción de "candado y llave" para formar un complejo entre el antígeno y el anticuerpo, en contraposición a la unión no específica y que puede ocurrir entre el anticuerpo y, por ejemplo, los componentes en una mezcla que incluye la sustancia de prueba con la que se hace reaccionar el anticuerpo. De esta manera, un anticuerpo anti-VHB es una molécula que se une de forma específica a un epitopo de una

5 proteína del VHB. El término "anticuerpo" tal como se utiliza en el presente documento incluye anticuerpos obtenidos tanto de preparaciones policlonales como monoclonales, así como, los siguientes: moléculas de anticuerpo híbrido (quimérico) (véase, por ejemplo, Winter y otros, Nature (1991) 349:293-299 y patente en los Estados Unidos No. 4.816.567); fragmentos F(ab')₂ y F(ab); moléculas Fv (heterodímeros no covalentes, véase, por ejemplo, Inbar y otros, Proc Natl Acad Sci EE.UU. (1972) 69:2659-2662; y Ehrlich y otros, Biochem (1980) 19:4091-4096); moléculas Fv de cadena individual (sFv) (véase, por ejemplo, Huston y otros, Proc Natl Acad Sci EE.UU. (1988) 85:5879-5883); construcciones de fragmentos de anticuerpo diméricos y triméricos; minicuerpos (véase, por ejemplo, Pack y otros, Biochem (1992) 31:1579-1584; Cumber y otros, J Immunology (1992) 149B:120-126); moléculas de anticuerpo humanizado (véase, por ejemplo, Riechmann y otros, Nature (1988) 332:323-327; Verhoevan y otros, Science (1988)239:1534-1536; y publicación de la patente en el Reino Unido No. GB 2.276.169, publicada el 21 de Septiembre de 1994); y cualquier fragmento funcional obtenido de tales moléculas, en los que tales fragmentos retengan las propiedades inmunológicas de unión de la molécula de anticuerpo de origen.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición de anticuerpos que tiene una población homogénea de anticuerpos. El término no se limita con respecto a la especie o fuente del anticuerpo, ni pretende que se limite por la manera en la que se elabora. El término abarca inmunoglobulinas enteras así como fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos, así como poblaciones homogéneas de anticuerpos quiméricos y humanizados, que muestran las propiedades inmunológicas de unión de la molécula de anticuerpo monoclonal de origen.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal de conejo" se refiere a un anticuerpo monoclonal, tal como se ha definido anteriormente, producido al inmunizar un conejo con un antígeno de interés (por ejemplo, un HbsAg mutante). Un "anticuerpo monoclonal de conejo" se puede producir utilizando hibridomas de conejo-conejo (es decir, fusiones entre una célula productora de anticuerpos del conejo inmunizado con una célula inmortalizada de un conejo), hibridomas de conejo-ratón (es decir, fusiones entre una célula productora de anticuerpos del conejo inmunizado con una célula inmortalizada de un ratón), y similares, descrito más detalladamente a continuación.

30 Un "anticuerpo monoclonal de ratón" se refiere a un anticuerpo monoclonal, tal como se define anteriormente, producido al inmunizar un ratón, con un antígeno de interés (por ejemplo, un HbsAg mutante). Un "anticuerpo monoclonal de ratón" se produce utilizando métodos convencionales bien conocidos en la técnica, a partir de hibridomas de ratón-ratón, descrito a continuación.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, un "soporte sólido" se refiere a una superficie sólida a la que se puede unir una macromolécula, por ejemplo, un anticuerpo, proteína, polipéptido, péptido, polinucleótido, tales como una perla magnética, perla de látex, pocillo de placa de microtitulación, placa de vidrio, nailon, agarosa, poli(acrilamida), partícula de sílice, membrana de nitrocelulosa y similares.

40 "Inmunológicamente reactivo" se refiere a que el anticuerpo en cuestión reaccionará de forma específica con antígenos de VHB presentes en una muestra biológica de un individuo infectado con VHB.

45 Un "fragmento inmunorreactivo" de un anticuerpo, es una molécula que consiste de solo una porción de la secuencia y estructura intacta del anticuerpo, y que es inmunológicamente reactivo tal como se define anteriormente. Los ejemplos no limitantes de tales fragmentos inmunorreactivos incluyen moléculas de F(ab')₂, Fv y sFv, que son capaces de mostrar propiedades inmunológicas de unión de la molécula de anticuerpo de origen de la cual se derivan.

50 "Complejo inmune" se refiere a la combinación formada cuando un anticuerpo se une a un epítipo en un antígeno.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, una "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o fluido aislado de un sujeto tal como, pero no limitada a, sangre, plasma, plaquetas, suero, materia fecal, orina, médula ósea, bilis, fluido espinal, fluido linfático, fluido cerebrospinal, muestras de piel, secreciones de la piel, tracto respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias y también muestras de constituyentes de cultivos celulares *in vitro* que incluyen pero no se limitan a medios acondicionados que resultan del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo, células recombinantes, y componentes celulares. Las muestras detalladas anteriormente no deben estar necesariamente en la forma obtenida directamente de la fuente. Por ejemplo, la muestra se puede tratar antes de su utilización, tal como por ejemplo, por calentamiento, centrifugación, etc., antes del análisis.

65 Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "marca" y "marca detectable" se refieren a una molécula capaz de detectar, incluyendo, pero sin limitarse a, isótopos radioactivos, agentes fluorescentes, nanocristales semiconductores, agentes quimioluminiscentes, cromóforos, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, colorantes, iones metálicos, soluciones coloidales de metales, ligandos (por ejemplo biotina, estreptavidina o haptenos) y similares. El término "agente fluorescente", se refiere

a una sustancia o una porción de la misma que es capaz de mostrar fluorescencia en el rango detectable. Los ejemplos particulares de marcas que se pueden utilizar de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano (HRP), fluoresceína, FITC, rodamina, dansilo, umbeliferona, éster de dimetil-acridinio (DMAE), Rojo de Texas, luminol, NADPH y α - β -galactosidasa.

5

II. MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Antes de describir la presente invención en detalle, se debe entender que esta invención no se limita a las formulaciones particulares o parámetros de proceso particulares dado que tales pueden, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología utilizada en el presente documento es para el propósito de describir únicamente realizaciones particulares de la invención y no pretende ser limitante.

10

Aunque se pueden utilizar varios métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento, para llevar a cabo la presente invención, los materiales y métodos preferentes se describen en el presente documento.

15

La presente invención se basa en el descubrimiento que nuevos anticuerpos monoclonales de conejo, dirigidos contra HBsAg mutantes, son mucho más inmunorreactivos en ensayos para detectar infección por VHB que los anticuerpos monoclonales convencionales de ratón. Los anticuerpos monoclonales de conejo de la presente invención son mucho más reactivos con una variedad más amplia de mutantes de HbsAg que los anticuerpos monoclonales convencionales de ratón. Además, los anticuerpos monoclonales de conejo de la presente invención son también típicamente reactivos con los HBsAg tipo salvaje. De hecho, un solo anticuerpo monoclonal de conejo de acuerdo a la presente invención es tan efectivo como la utilización de múltiples anticuerpos monoclonales de ratón para detectar la presencia de antígenos del VHB, que puede ser indicativo de infección por VHB. De esta manera, los anticuerpos monoclonales de conejo de la presente invención disminuyen el número de falsos negativos obtenidos con ensayos que utilizan, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón y, por lo tanto, son útiles en métodos de diagnóstico para detectar de forma precisa la infección por VHB. Los ensayos de la presente invención también pueden utilizar anticuerpos adicionales, tal como anticuerpos monoclonales de ratón adicionales, para proporcionar la capacidad para diagnosticar infección por VHB para una amplia variedad de aislados y mutantes de escape.

20

25

30

Los métodos son útiles para detectar infección por VHB en humanos, así como para detectar infección por VHB en muestras sanguíneas, incluyendo sin limitación, en sangre entera, suero, plaquetas y plasma, así como en tejidos y órganos para trasplante, en particular al detectar la presencia de antígenos del VHB o anticuerpos contra el VHB. De esta manera, los métodos se pueden utilizar para diagnosticar infección por VHB en un sujeto, tal como un sujeto humano, así como para detectar contaminación por VHB en muestras sanguíneas donadas. Se pueden cribar para la presencia del VHB alícuotas de muestras donadas individuales y aquellas muestras o muestras agrupadas contaminadas con VHB se pueden eliminar antes de que se combinen. De esta manera, se puede proporcionar un suministro sanguíneo sustancialmente libre de contaminación por VHB. De manera similar, las muestras de tejidos y órganos que se van a utilizar en el trasplante también se pueden cribar a fin de eliminar especímenes contaminados.

35

40

A fin de entender adicionalmente la invención, se proporciona un análisis más detallado a continuación con respecto a los antígenos del VHB, anticuerpos y métodos de diagnóstico para utilización con la presente invención.

45

Antígenos de Superficie del VHB

Los antígenos de superficie de hepatitis B están constituidos de tres clases de tamaños de proteínas que comparten las secuencias carboxi-terminales. Estas proteínas incluyen grandes (L, el dominio preS2), medianas (M, el dominio preS1), y pequeñas (S, el dominio sAg). Las tres proteínas se encuentran en viriones infecciosos (frecuentemente referidos como partículas Dane) recuperados como esferas de 42 nm del suero de pacientes infectados. Las muestras de suero también contienen partículas esféricas vacías que promedian 22 nm, que contienen principalmente la clase S de las proteínas (sAg). Las líneas de células de mamífero transfectadas exclusivamente con ADN que codifica para la proteína sAg liberan esferas vacías de 20 nm similares a aquellas de células infectadas. Además, las células de levadura transformadas con el mismo gen forman esferas análogas, que se encuentra que son igualmente inmunogénicas que las esferas de 22 nm de células infectadas. Véase, por ejemplo, "VHB Vaccines from the laboratory to license: a case study" en Mackett, M. y Williamson, J.D., Human Vaccines and Vaccination págs. 159-176, para un análisis de la estructura del VHB; y las Patentes en los Estados Unidos Nos. 20 4.722.840, 5.098.704, 5.324.513, 5.965.140, Beames y otros, J. Virol. (1995) 69:6833-6838, Birnbaum y otros, J. Virol. (1990) 64:3319-3330, Zhou y otros, J. Virol. (1991) 65:5457- 5464, para descripciones de la producción recombinante de varias partículas de VHB.

50

55

60

De esta manera, tal como se explica anteriormente, los HBsAg para la utilización en la producción de anticuerpos monoclonales de conejo de la presente invención pueden incluir regiones inmunogénicas de sAg, preS1 y/o preS2, así como regiones inmunogénicas de cualquier combinación de los anteriores, tales como sAg/preS1,

65

sAg/preS2 y sAg/preS1/preS2. Opcionalmente, un polipéptido de HBsAg puede comprender más de un polipéptido de sAg, preS1, o preS2. Adicionalmente, los polipéptidos de sAg, preS1 y preS2 pueden estar derivados de los mismos o diferentes aislados del VHB. Estos polipéptidos también se pueden proporcionar como una proteína de fusión o como polipéptidos separados. Las secuencias de los HBsAg de cientos de diferentes aislados de VHB se conocen y se pueden obtener fácilmente de la base de datos NCBI.

Un HBsAg preferente para utilización en la invención comprende, como mínimo, la secuencia de aminoácidos de la región determinante "a" del VHB (aminoácidos 124-147, numerados con relación al sAg). Las secuencias representativas tipo salvaje para esta región son CTTPAQGNSMFPSCCCTKPSDGNC (SEQ ID NO: 4, adw tipo salvaje); y CMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC (SEQ ID NO: 5, ayw tipo salvaje). Las mutaciones en esta región de sAg se han encontrado en un gran número de evasores de la vacuna contra el VHB. Para descripciones de varias variantes de HBsAg, véase, Ashton-Richardt PG, Murray K. (1989) Mutants of the hepatitis B virus surface antigen and define some antigenically essential residues in the immunodominant "a" region, *J. Medical Virology* 29: 196-203; Norder H, Courouce A_M, Magnius L (1992) Molecular basis of hepatitis B virus serotype variation within the four major subtype. *J. General Virology* 73: 3141 - 3145; Carman WF, Zanetti AR, y otros (1999) Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336-329; Fujii H, Moriyama K. y otros Gly 145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochem. Biophys Res Comm* 184: 1152-1157; Carman, W. Vaccine-associated mutants of hepatitis B virus. *Viral Hepatitis and Liver Disease* (1945) págs:243-247, Eds: K. Nishioka, H. Suzuki, s. Mushiro T. Oda).

De esta manera, los HBsAg que incluyen mutaciones en esta región son particularmente útiles en el presente documento. Los mutantes representativos para esta región incluyen F134A, F134S, G145R, S143L, P142S y Q129R/M133T. En cada una de las designaciones de los mutantes, el número indica la posición del aminoácido sustituido, la letra antes del número indica el aminoácido en esa posición en la secuencia de WT y la letra después del número indica el aminoácido en esa posición en el mutante. Estos mutantes son meramente representativos y se debe entender que existe un gran número de mutantes adicionales que se presentan de forma natural, mutantes que serán útiles en la presente invención. Adicionalmente, los mutantes sintéticos con mutaciones en la región determinante "a" también serán útiles en la presente invención. Las variantes que tienen mutaciones en regiones diferentes de la región determinante "a" tal como se define anteriormente, también pueden ser útiles en la presente invención. Por ejemplo, la variante que tiene una sustitución de Q por P en la posición 120 de aminoácido (P120Q) es útil como antígeno para generar anticuerpos monoclonales.

Antígenos para su utilización según la presente invención se pueden obtener utilizando técnicas estándar. Los antígenos del VHB se pueden generar de manera conveniente utilizando métodos recombinantes, bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes en los Estados Unidos Nos. 4.772.840; 5.098.704; 5.324.513; 5.965.140 y 6.306.625, para descripciones de la producción recombinante de antígenos del VHB. Por ejemplo, se puede aislar la secuencia codificante de la proteína S de HBsAg por extracción con fenol del ADN de las partículas Dane presentes en suero humano infectado, utilizando métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en la patente en los Estados Unidos número 4.710.463. El ADN aislado se puede, a continuación, digerir con una endonucleasa de restricción. La elección de endonucleasa dependerá, en parte, de las partículas Dane particulares. Por ejemplo, la secuencia codificante de HBsAg del ADN del VHB de ciertas partículas Dane del serotipo adw se pueden aislar como un único fragmento de *BamHI*; la secuencia codificante de HBsAg del ADN del VHB de ciertas partículas Dane del serotipo ayw se puede aislar como un fragmento de *HhaI*. El ADN del VHB de las partículas Dane del mismo serotipo también puede mostrar diferentes patrones de sitios de restricción.

Se pueden concebir sondas de oligonucleótidos en base a las secuencias conocidas del genoma del VHB y utilizarlas para sondear bibliotecas genómicas o de ADNc para genes del VHB que codifican para los antígenos útiles en la presente invención. Los genes, a continuación, se pueden aislar adicionalmente utilizando técnicas normales y, si se desea, enzimas de restricción empleadas para mutar el gen en porciones deseadas de la secuencia de longitud completa. Véase, por ejemplo, Sambrook y otros, *supra*, para una descripción de las técnicas utilizadas para obtener y aislar el ADN.

Finalmente, los genes que codifican para los antígenos del VHB se pueden producir de forma sintética, en base a secuencias conocidas. La secuencia de nucleótidos se puede diseñar con los codones apropiados para la secuencia particular de aminoácidos deseada. En general, se seleccionarán codones preferentes para el hospedador propuesto en el que se expresará la secuencia. La secuencia completa se ensambla, generalmente, a partir de oligonucleótidos de solapantes preparados por métodos normales y ensamblados en una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge, *Nature* (1981) 292:756; Nambair y otros, *Science* (1984) 223:1299; Jay y otros, *J. Biol. Chem.* (1984) 259:6311.

Los polinucleótidos pueden comprender secuencias codificantes para los varios polipéptidos que se presentan de forma natural o pueden incluir secuencias artificiales que no se presentan en la naturaleza. Estos polinucleótidos, si se desea, se pueden ligar para formar una secuencia codificante para una proteína de fusión, utilizando técnicas normales de biología molecular.

Una vez que se han preparado o aislado tales secuencias codificantes, las secuencias se pueden clonar en cualquier vector o replicón adecuado. Numerosos vectores de clonación son conocidos por aquellos expertos en la técnica, y la selección de un vector de clonación apropiado es una cuestión de elección. Los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagos, transposones, cósmidos, cromosomas o virus que son capaces de replicar cuando se asocian con los elementos de control apropiados. La secuencia codificante, a continuación, se coloca bajo el control de elementos de control adecuados, dependiendo del sistema que se vaya a utilizar para la expresión. De esta manera, la secuencia codificante se puede colocar bajo el control de un promotor, sitio de unión a ribosoma (para expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador, de modo que la secuencia de ADN de interés se transcriba en ARN por un transformante adecuado. La secuencia codificante puede contener o no un péptido señal o secuencia líder que puede ser eliminada más adelante por el hospedador en el procesamiento post-transduccional. Véase, por ejemplo, las patentes en los Estados Unidos Nos. 4.431.739; 4.425.437; 4.338.397.

Si está presente, la secuencia señal puede ser líder nativa encontrada en asociación con el antígeno de interés del VHB. Alternativamente, puede estar presente una secuencia señal heteróloga que puede incrementar la eficiencia de la secreción. Se conocen en la técnica varias secuencias líder representativas e incluyen, sin limitación, la líder del factor α de levadura, el péptido señal de TPA, el péptido señal de Ig y similares. Las secuencias para éstas y otras secuencias líder son ampliamente conocidas.

Además de las secuencias de control, puede ser deseable adicionar secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión de las secuencias con relación al crecimiento de la célula hospedadora. Las secuencias reguladoras son conocidas por aquellos expertos en la materia y los ejemplos incluyen aquellas que provocan que se active e desactive la expresión de un gen en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. También pueden estar presentes otros tipos de elementos reguladores en el vector. Por ejemplo, en el presente documento se pueden utilizar elementos incrementadores para aumentar los niveles de expresión de los constructos. Los ejemplos incluyen el incrementador de genes tempranos de SV40 (Dijkema y otros (1985) EMBO J. 4:761), el incrementador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR) del Virus de Sarcoma de Rous (Gorman y otros (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 79:6777) y elementos derivados del CMV humano (Boshart y otros (1985) Cell 41:521), tales como elementos incluidos en la secuencia del intrón A de CMV (patente en los Estados Unidos No. 5.688.688). El casete de expresión puede incluir además un origen de replicación para replicación autónoma en una célula hospedadora adecuada, uno o más marcadores seleccionables, uno o más sitios de restricción, un potencial para un alto número de copias y un promotor fuerte.

Se construye un vector de expresión de manera que la secuencia codificante particular se localice en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas, la colocación y orientación de la secuencia codificante con respecto a las secuencias de control es tal que la secuencia codificante se transcribe bajo el "control" de las secuencias de control (es decir, la ARN- polimerasa que se une a la molécula de ADN en las secuencias de control transcribe la secuencia codificante). Puede ser deseable la modificación de las secuencias que codifican la molécula de interés para conseguir tal objetivo. Por ejemplo, en algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de manera que se pueda unir a las secuencias de control en la orientación apropiada; es decir, para mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden estar ligadas a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector. Alternativamente, la secuencia codificante se puede clonar directamente en un vector de expresión que contenga ya las secuencias de control y un sitio apropiado de restricción.

Se puede construir o utilizar cualquier vector de expresión adecuado para expresar cualquier forma de HBsAg de la invención. Un ejemplo de vector es pCMVII, un vector de clonación basado en pUC19 diseñado para la expresión en células de mamífero. pCMVII comprende los siguientes elementos: incrementador/promotor IE de CMV humano, intrón A de CMV humana, un líder del activador de plasminógeno de tejido humano (tPA), un terminador de poli A de la hormona de crecimiento bovina (BGHt), un origen de replicación de ColEI, y un gen de resistencia a ampicilina *Amp* R. Por ejemplo, pCMVII- pS2-sAg se puede utilizar para la expresión de preS2-sAg. En este vector, las secuencias codificantes para los dominios sAg y preS2 de HBsAg se ha insertado en pCMVII entre el intrón A de CMV y BGHt. Este vector también se puede modificar por ejemplo, eliminando el dominio preS2 o adicionando la secuencia codificante para el dominio preS1. Estos vectores se proporcionan a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance de la invención. Los vectores anteriores se describen en detalle en la patente en los Estados Unidos No. 6.740.323.

Tal como se explica anteriormente, también puede ser deseable producir mutantes o análogos del polipéptido de interés. Los mutantes o análogos de los polipéptidos del VHB para utilización en las presentes composiciones se pueden preparar por la delección de una porción de la secuencia que codifica la molécula de interés, por inserción de una secuencia, y/o por sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos, tal como mutagénesis dirigida al sitio, y similares, son bien conocidas por aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook y otros, *supra*; Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1985):448; Geisselsoder y otros (1987) BioTechniques:786; Zoller y Smith (1983) Methods Enzymol. 100:468; Dalbie-20 McFarland y otros (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 79:6409.

Las moléculas se pueden expresar en una amplia variedad de sistemas, incluyendo sistemas de expresión de insecto, mamífero, bacteriano, viral y de levadura, todos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los sistemas de expresión en células de insecto, tales como los sistemas de baculovirus, son conocidos por aquellos expertos en la materia y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987). Los materiales y métodos para los sistemas de expresión en células de insecto/ baculovirus están comercialmente disponibles en forma de kit, entre otros, de Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac"). De manera similar, los sistemas de expresión en células bacterianas y de mamífero son bien conocidos en la técnica y se describen por ejemplo, en Sambrook y otros, *supra*. Los sistemas de expresión en levadura también son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Yeast Genetic Engineering (Barr y otros, eds., 1989) Butterworths, Londres.

También se conocen varias células hospedadoras apropiadas para utilización con los sistemas anteriores. Por ejemplo, se conocen en la técnica líneas de células de mamífero e incluyen líneas de células inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), tales como, pero no limitadas a, células de ovario de hámster Chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster neonato (BHK), células de riñón de mono (COS), células de riñón embrionario humano, células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino de Madin-Darby ("MDBK"), así como otras. De manera similar, los hospedadores bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, y *Streptococcus spp.*, serán útiles con las presentes construcciones de expresión. Los hospedadores de levadura útiles en la presente invención incluyen, entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guillermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Las células de insecto para utilización con los vectores de expresión para baculovirus incluyen, entre otros, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni*.

Las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos de interés se pueden integrar de manera estable en el genoma de una célula hospedadora o mantener como un elemento episomal estable en una célula hospedadora adecuada utilizando varias técnicas de distribución de genes conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente en los Estados Unidos No. 5.399.346.

Dependiendo del sistema de expresión y el hospedador seleccionados, las moléculas se producen al cultivar las células hospedadoras transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente bajo condiciones con las que se exprese la proteína. La proteína expresada, a continuación, se aísla de las células hospedadoras y se purifica. Si el sistema de expresión secreta la proteína al medio de crecimiento, el producto se puede purificar directamente del medio. Si no se secreta, se puede aislar de los lisados celulares. La selección de las condiciones apropiadas de crecimiento y los métodos de recuperación son conocidos por un experto en la materia.

Los antígenos del VHB también se pueden sintetizar utilizando síntesis química de polímeros tal como la síntesis de péptidos en fase sólida. Tales métodos son conocidos por aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, J. M. Stewart y J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2a Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) y G. Barany y R. B. Merrifield, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, editores E. Gross y J. Meienhofer, Vol. 2, Academia Press, Nueva York, (1980), págs. 3 -254, para técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida.

Los antígenos del VHB, obtenidos tal como se describe anteriormente, se utilizan, a continuación, para producir anticuerpos monoclonales de conejo para utilización en diagnóstico.

50 **Anticuerpos anti -VHB**

Los antígenos del VHB se pueden utilizar para producir anticuerpos policlonales y monoclonales específicos contra el VHB para utilización en ensayos de detección y de diagnóstico. Los anticuerpos policlonales y monoclonales específicos contra el VHB se unen específicamente a antígenos del VHB. En particular, los antígenos del VHB se pueden utilizar para producir anticuerpos policlonales administrando el antígeno del VHB a un mamífero, tal como un ratón, una rata, un conejo, una cabra o un caballo. El suero del animal inmunizado se recolecta y los anticuerpos se purifican del plasma, por ejemplo, por precipitación con sulfato de amonio, seguida por cromatografía, preferentemente cromatografía de afinidad. Son conocidas en la técnica las técnicas para producir y procesar antisueros policlonales.

Los anticuerpos monoclonales de conejo y ratón dirigidos contra epítomos específicos del VHB presentes en las proteínas también se pueden producir fácilmente. Para producir anticuerpos monoclonales, el mamífero de interés, tal como un conejo o ratón, se inmuniza, tal como mezclando o emulsionando el antígeno en solución salina, preferentemente en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund ("FCA"), e inyectando la mezcla o emulsión parenteralmente (generalmente subcutánea o intramuscularmente). El animal se refuerza, generalmente, 2-6 semanas después con una o más inyecciones del antígeno en solución salina,

preferentemente utilizando el adyuvante incompleto de Freund ("FIA"). En una realización, el animal se inmuniza con uno o más mutantes de HBsAg, de manera preferente se utiliza una mezcla de 2 a 5 mutantes de HbsAg diferentes. Los HBsAg tipo salvaje también se pueden incluir en el inmunógeno. En un régimen preferente, el animal, preferentemente un conejo, se inmuniza inicialmente con un HBsAg tipo salvaje y, posteriormente, se refuerza con uno o más mutantes de HBsAg. Particularmente útiles como inmunógenos son los mutantes de HBsAg que se ha encontrado que se presentan de forma natural, por ejemplo, D3, D2, D1, Y1, Y2, descritos más ampliamente a continuación. Los anticuerpos también se pueden generar por inmunización *in vitro*, utilizando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, James y otros, J. Immunol. Meth (1987) 100:5-40.

A continuación, se obtienen antisueros policlonales del animal inmunizado. Sin embargo, en lugar de sangrar al animal para extraer suero, se retira el bazo (y opcionalmente varios nódulos linfáticos grandes) y se disocia en células individuales. Si se desea, las células del bazo (esplenocitos) se pueden cribar (después de la eliminación de las células adherentes de forma no específica) por aplicación de una suspensión celular a una placa o pocillo recubierto con el antígeno. Las células B, que expresan inmunoglobulina unida a membrana específica para el antígeno, se unirán a la placa, y no serán lavadas con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todos los esplenocitos disociados, se inducen, a continuación, a fusionarse con células de una línea celular inmortalizada (también llamada un "compañero de fusión"), para formar hibridomas. Típicamente, el compañero de fusión incluye una propiedad que permite la selección de los hibridomas resultantes utilizando medios específicos. Por ejemplo, los compañeros de fusión pueden ser sensibles a hipoxantina/aminopterina/timidina (HAT).

Si se desean hibridomas de conejo-conejo, la línea celular inmortalizada será de un conejo. Tales compañeros de fusión derivados de conejo son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, células de origen linfoide, tales como células de un plasmacitoma de conejo tal como se describe en Spieker-Polet y otros, Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU. (1995) 92:9348-9352 y en la patente en los Estados Unidos No. 56.75.063, o el compañero de fusión TP-3 descrito en la patente en los Estados Unidos No. 4.859.595. Si se desea un hibridoma de conejo-ratón o un hibridoma de rata-ratón o ratón-ratón, o similar, el compañero de fusión de ratón se derivará de una línea celular inmortalizada de un ratón, tal como una célula de origen linfoide, típicamente de una línea celular de mieloma de ratón. Se conocen en la técnica varias de tales líneas celulares y están disponibles en la ATCC.

La fusión se logra utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los productos químicos que promueven la fusión son referidos comúnmente como fusógenos. Estos agentes son extremadamente hidrófilos y facilitan el contacto con la membrana. Un método particularmente preferente de fusión celular utiliza polietilenglicol (PEG). Otro método de fusión celular es la electrofusión. En este método, se exponen las células a una descarga eléctrica predeterminada que altera el potencial de la membrana celular. Métodos adicionales para la fusión celular incluyen métodos de fusión tipo puente. En este método, el antígeno se biotinila y el compañero de fusión se trata con avidina. Cuando las células son añadidas juntas, se forma un puente de antígeno-célula B reactiva-antígeno-biotina-avidina-compañero de fusión. Esto permite la fusión específica de una célula reactiva a antígeno con una célula inmortalizada. El método puede emplear adicionalmente medios químicos o eléctricos para facilitar la fusión celular.

Después de la fusión, las células se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, medio HAT). Para incrementar la secreción del anticuerpo, se puede utilizar de forma opcional un agente que tiene efectos de estimulación secretoria, tal como IL-6. Véase, por ejemplo, Liguori y otros, Hybridoma (2001) 20:189-198. Los hibridomas resultantes se pueden colocar en placa por dilución límite, y son valorados para la producción de anticuerpos que se unen de forma específica al antígeno de inmunización (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas seleccionados que segregan anticuerpos monoclonales, a continuación, se cultivan *in vitro* (por ejemplo, en botellas de cultivo de tejido o reactores de fibra hueca), o *in vivo* (por ejemplo, como ascitis en ratones). Por ejemplo, se pueden identificar hibridomas que producen anticuerpos específicos contra el VHB utilizando RIA o ELISA y aislar por clonación en agar semisólido o por dilución límite. Se pueden aislar clones que producen anticuerpos específicos contra el VHB por otra ronda de cribado.

Una técnica alternativa para generar los anticuerpos monoclonales de conejo de la presente invención es el método del anticuerpo de linfocito seleccionado (SLAM). Este método comprende identificar un único linfocito que está produciendo un anticuerpo con la especificidad o función deseada dentro de una gran población de células linfoides. A continuación, la información genética que codifica para la especificidad del anticuerpo (es decir, el ADN del V_H y V_L de inmunoglobulina) se rescata y clona. Véase, por ejemplo, Babcook y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1996) 93:7843-7848, para una descripción de este método.

Para descripciones adicionales de anticuerpos monoclonales de conejo y métodos para fabricar los mismos a partir de fusiones de conejo-conejo y conejo-ratón, véase, por ejemplo, las patentes en los Estados Unidos No. 5.675.063 (conejo-conejo); 4.859.595 (conejo-conejo); 5.472.868 (conejo-ratón), y 4.977.081 (conejo-ratón). Para una descripción de la producción de anticuerpos monoclonales convencionales de ratón, véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature (1975) 256:495-497.

Puede ser deseable proporcionar anticuerpos quiméricos. Se pueden formar anticuerpos quiméricos compuestos

de secuencias de aminoácidos humanas y no humanas a partir de las moléculas de anticuerpos monoclonales descritas anteriormente para reducir su inmunogenicidad en humanos (Winter y otros (1991) *Nature* 349:293, Lobuglio y otros (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:4220; Shaw y otros (1987) *J Immunol.* 138:4534; y Brown y otros (1987) *Cancer Res.* 47:3577; Riechmann y otros (1988) *Nature* 332:323; Verhoeyen y otros (1988) *Science* 239:1534; y Jones y otros (1986) *Nature* 321:522; la publicación EP No. 519.596, publicada el 23 de diciembre de 1992; y la publicación de Patente en el Reino Unido número GB 2.276.179, publicada el 21 de septiembre de 1994).

Los fragmentos de moléculas de anticuerpo, por ejemplo, las moléculas de $F(ab')_2$, Fv, y sFv, que son capaces de mostrar propiedades inmunológicas de unión de la molécula de anticuerpo monoclonal de origen, se pueden producir utilizando técnicas conocidas. Inbar y otros (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 69:2659; Hochman y otros (1976) *Biochem* 15:2706; Ehrlich y otros (1980) *Biochem* 19:4091; Huston y otros (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 85(16):5879; y las patentes en los Estados Unidos Nos. 5.091.513 y 5.132.405, de Houston y otros; y 4.946.778, de Ladner y otros.

Alternativamente, se puede utilizar un sistema de presentación en fagos para expandir las poblaciones de moléculas de anticuerpos monoclonales *in vitro*. Saiki, y otros (1986) *Nature* 324:163; Scharf y otros (1986) *Science* 233:1076; las patentes en los Estados Unidos Nos 4.683.195 y 4.683.202; Yang y otros (1995) *J Mol Biol* 254:392; Barbas, III y otros (1985) *Methods: Comp. Meth Enzymol* 8:94; Barbas, III y otros (1991) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 88:7978.

Una vez generada, la biblioteca de presentación en fagos se puede utilizar para mejorar la afinidad de unión inmunológica de las moléculas de Fab utilizando técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Figini y otros (1994) *J. Mol. Biol.* 239:68. Las secuencias codificantes para las porciones de cadena pesada y ligera de las moléculas de Fab seleccionadas de la biblioteca de presentación en fagos se pueden aislar o sintetizar, y clonar en cualquier vector o replicón adecuado para expresión. Se puede utilizar cualquier sistema de expresión adecuado, incluyendo aquellos descritos anteriormente.

Las secuencias de polinucleótidos que codifican para los anticuerpos monoclonales de conejo y los fragmentos inmunorreactivos de los mismos, descritos anteriormente, se obtienen fácilmente utilizando técnicas normales, bien conocidas, tales como aquellas técnicas descritas anteriormente con respecto a los HBsAg.

Los anticuerpos que se dirigen contra epítomos del VHB, son particularmente útiles para detectar la presencia del VHB o antígenos del VHB en una muestra, tal como una muestra de suero de un humano infectado con VHB. Un inmunoensayo para un antígeno del VHB puede utilizar un anticuerpo o varios anticuerpos o solos o en combinación con antígenos del VHB. Un inmunoensayo para un antígeno del VHB puede utilizar, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal dirigido hacia un epítomo del VHB, una combinación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epítomos de un polipéptido del VHB, anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epítomos de diferentes polipéptidos del VHB, anticuerpos policlonales dirigidos hacia el mismo antígeno del VHB, anticuerpos policlonales dirigidos hacia diferentes antígenos del VHB, o una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales. Por ejemplo, se pueden utilizar tanto anticuerpos monoclonales de conejo como de ratón en los presentes ensayos. Los protocolos de inmunoensayos se pueden basar, por ejemplo, en ensayos de competición, de reacción directa, o tipo sándwich, utilizando por ejemplo, anticuerpo marcado, y se describen a continuación de forma adicional. Las marcas pueden ser, por ejemplo, fluorescentes, quimioluminescentes o radioactivas.

Los anticuerpos anti-VHB se pueden utilizar adicionalmente para aislar partículas de VHB o antígenos por columnas de inmunoafinidad. Los anticuerpos se pueden fijar a un soporte sólido, por ejemplo, por adsorción o por enlace covalente de manera que los anticuerpos retengan su actividad inmunoselectiva. Opcionalmente, se pueden incluir grupos separadores de manera que el sitio de unión a antígeno del anticuerpo permanezca accesible. Los anticuerpos inmovilizados, a continuación, se pueden utilizar para unirse a partículas o antígenos del VHB de una muestra biológica, tal como sangre o plasma. Las partículas o antígenos del VHB unidas se recuperan de la matriz de la columna, por ejemplo, por un cambio en el pH.

Los anticuerpos anti-VHB preferentes son aquellos producidos por las líneas celulares de hibridoma 99S9 (CMCC #12336) y 99S6 (CMCC #12337) (números de acceso ATCC PTA-6014 y PTA-6015, respectivamente) así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$, Fv, sFv) y anticuerpos quiméricos o humanizados derivados de los mismos.

60 **Ensayos de diagnóstico del VHB**

Tal como se explica anteriormente, los anticuerpos anti-VHB producidos tal como se describe anteriormente, se pueden utilizar en ensayos para identificar infección por VHB. Los anticuerpos anti-VHB se pueden utilizar como el componente de captura y/o como el componente de detección en los ensayos, tal como se describe a continuación de forma adicional. De esta manera, la presencia del VHB en una muestra biológica se puede determinar por la presencia de antígenos del VHB y/o anticuerpos anti-VHB como un indicador del VHB en la

muestra. Los anticuerpos monoclonales se pueden utilizar para detectar el VHB en muestras sanguíneas, incluyendo sin limitación, en sangre entera, suero, plaquetas y plasma. Los anticuerpos se pueden utilizar para detectar infección por VHB en un sujeto, tal como un sujeto humano, así como para detectar contaminación por VHB en muestras sanguíneas donadas detectando la presencia de antígenos del VHB, particularmente HBsAg, y anticuerpos contra el VHB, dependiendo del ensayo utilizado. De esta manera, las alícuotas de muestras donadas individuales o muestras agrupadas se pueden cribar para la presencia del VHB y se pueden eliminar aquellas muestras o muestras agrupadas contaminadas con VHB antes de que se combinen. De esta manera, se puede proporcionar un suministro sanguíneo sustancialmente libre de contaminación por VHB. El término "sustancialmente libre de VHB" se refiere a que la presencia del VHB no se detecta utilizando los ensayos descritos en el presente documento. De manera similar, los métodos de la presente invención se pueden utilizar para cribar muestras potenciales de tejidos y órganos para el trasplante y se pueden descartar tejidos y órganos contaminados.

Los ensayos para utilización en el presente documento incluyen transferencia Western; pruebas de aglutinación; inmunoensayos mediados y marcados con enzimas, tal como ELISA; ensayos tipo biotina/avidina y biotina/estreptavidina; inmunoensayos mediados por proteína A o proteína G; radioinmunoensayos; inmunolectroforesis; inmunoprecipitación, ensayos de inmunotransferencia en tira, y similares. Las reacciones incluyen, generalmente, marcas detectables tales como marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas, enzimáticas o moléculas colorantes, u otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno de VHB presente en la muestra y el anticuerpo o anticuerpos puestos en contacto con la misma.

Los ensayos mencionados anteriormente comprenden, generalmente, separación de anticuerpos o antígenos no unidos en una fase líquida de un soporte de fase sólida en el que se unen los complejos de antígeno-anticuerpo. Los soportes sólidos que se pueden utilizar en la práctica de la invención incluyen sustratos tal como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microtitulación); cloruro de polivinilo (por ejemplo, hojas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilidina; papel diazotizado; membranas de nylon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles, y similares.

En un aspecto de la invención, los anticuerpos monoclonales de conejo anti-HbsAg descritos en el presente documento, se utilizan para la captura o detección o ambas de antígenos del VHB, particularmente HBsAg, en una muestra. Los anticuerpos contra los HbsAg producidos tal como se describe anteriormente, se pueden utilizar para la captura o detección o ambas de antígenos del VHB en una muestra. El término "captura" de un analito (en el presente documento antígenos del VHB en una muestra) se refiere a que el analito se puede separar de los otros componentes de la muestra en virtud de la unión de la molécula de captura. Típicamente, la molécula de captura está asociada con un soporte sólido, de forma directa o indirecta. Típicamente, la molécula de detección se asocia con una marca detectable, de forma directa o indirecta.

Típicamente, se hace reaccionar primero un soporte sólido con un componente de fase sólida (por ejemplo, uno o más de los anticuerpos anti-VHB) bajo condiciones adecuadas de unión tal que se inmovilice de forma suficiente el componente al soporte. Algunas veces, se puede incrementar la inmovilización al soporte acoplado primero a una proteína con mejores propiedades de unión. Las proteínas de acoplamiento adecuadas incluyen, pero no se limitan a, proteína A o proteína G, macromoléculas tales como albúminas de suero incluyendo albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, y otras proteínas conocidas por aquellos expertos en la materia. Alternativamente, se puede utilizar un soporte sólido recubierto con estreptavidina o avidina para inmovilizar un anticuerpo biotinilado. Otras moléculas que se pueden utilizar para unir el anticuerpo al soporte incluyen polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácido poliméricos, copolímeros de aminoácidos y similares. Tales moléculas y métodos de acoplamiento de estas moléculas son conocidos por aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Brinkley, M.A. *Bioconjugate Chem.* (1992) 3:2-13; Hashida y otros, *J. App. Biochem.* (1984) 6:56-63; y Anjaneyulu y Staros, *International J. of Peptide and Protein Res.* (1987) 30:117-124.

Después de hacer reaccionar el soporte sólido con el componente de fase sólida, se elimina del soporte cualquiera de los componentes de fase sólida no inmovilizados por lavado, y el componente unido al soporte, a continuación, se pone en contacto con una muestra biológica que se sospecha que contiene el analito (por ejemplo, antígeno del VHB) bajo condiciones adecuadas de unión. Después del lavado para eliminar cualquier analito no unido, se puede añadir un resto de unión secundaria bajo condiciones adecuadas de unión, de manera que el aglutinante secundario es capaz de asociarse selectivamente con el ligando unido. La presencia del aglutinante secundario, a continuación, se puede detectar utilizando técnicas conocidas en la materia.

De manera más particular, se puede utilizar un método de ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación están recubiertos, directa o indirectamente, con los anticuerpos de conejo anti-VHB según la presente invención. Se pueden utilizar los anticuerpos anti-VHB de conejo dirigidos contra uno o más mutantes del VHB tal como se describe anteriormente. Preferentemente, se utilizan los anticuerpos monoclonales de conejo producidos por la línea de hibridoma 99S9 ó 99S6. Adicionalmente, también pueden estar presentes otros anticuerpos anti-VHB dirigidos contra HBsAg tipo salvaje, de la misma manera que pueden anticuerpos

monoclonales de ratón adicionales dirigidos contra un HBsAg tipo salvaje o un mutante de HBsAg. A continuación, se añade a los pocillos recubiertos una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene antígenos del VHB. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la unión antígeno-anticuerpo, la placa o placas se puede lavar para eliminar restos no unidos y se añade una molécula de unión secundaria de forma detectable marcada. La molécula de unión secundaria se deja reaccionar con cualquier muestra capturada, la placa se lava y la presencia de la molécula de unión secundaria se detecta utilizando métodos conocidos en la técnica.

En un formato particular, se utiliza un formato de ELISA Sándwich de antígeno. En este caso, el soporte sólido se recubre con anticuerpos anti-VHB dirigidos contra uno o más mutantes del VHB como se describe anteriormente. También pueden estar presentes anticuerpos anti-VHB dirigidos contra HBsAg tipo salvaje. La muestra, a continuación, se pone en contacto con el soporte bajo condiciones que permiten que los antígenos del VHB, si están presentes, se unan a uno o más de los anticuerpos para formar un complejo de antígeno/anticuerpo. Se eliminan antígenos no unidos y se añade un anticuerpo marcado con enzima que reacciona con el complejo de antígeno/anticuerpo unido, tal como un anticuerpo marcado anti-HBsAg. Se utiliza un sustrato de enzima para generar una señal. En esta realización particular, los anticuerpos anti-VHB que se recubren en el soporte sólido pueden ser anticuerpos monoclonales de conejo de la presente invención, preferentemente los anticuerpos producidos por el hibridoma 99S9 o hibridoma 99S6, o ambos. Alternativamente, o además, el anticuerpo marcado de forma detectable puede ser un anticuerpo monoclonal de conejo de la presente invención, preferentemente los anticuerpos producidos por el hibridoma 99S9 o hibridoma 99S6, o ambos.

En otra realización, se puede detectar fácilmente la presencia de analitos del VHB unidos de una muestra biológica utilizando un aglutinante secundario que comprende un anticuerpo dirigido contra los ligandos de antígeno. Se conocen en la técnica varias moléculas de inmunoglobulina (Ig) anti-humanas que se pueden conjugar fácilmente a una marca enzimática detectable, tal como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o ureasa, utilizando métodos conocidos por aquellos expertos en la materia. A continuación, se utiliza un sustrato enzimático apropiado para generar una señal detectable. En otras realizaciones relacionadas, se pueden llevar a cabo técnicas de ELISA tipo competitivo utilizando métodos conocidos por aquellos expertos en la materia.

Los anticuerpos anti-VHB de conejo de la invención también se pueden utilizar en un ELISA indirecto, por ejemplo, un ELISA indirecto de IgG tal como sigue. Los anticuerpos específicos para antígenos de superficie del VHB se unen a un soporte sólido. Se puede utilizar proteína A o proteína G para anticuerpos en el soporte sólido. El soporte, a continuación, se pone en contacto con HBsAg bajo condiciones que permiten la unión a los anticuerpos anti-VHB unidos al soporte para formar complejos de anticuerpo/antígeno. Se eliminan los antígenos no unidos y el soporte se pone en contacto con una muestra que se va a probar para la presencia de IgG humana contra el VHB bajo condiciones que permiten la unión de la IgG humana anti-VHB, si está presente, a los antígenos en los complejos de anticuerpo/antígeno. La presencia de IgG anti-VHB unida se puede detectar utilizando un anticuerpo anti-IgG humana de forma detectable marcado. De igual manera, se puede detectar la presencia de IgM humana contra el VHB utilizando anti-IgM humana marcado para unirse a los complejos de anticuerpo/antígeno.

Los anticuerpos de conejo anti-VHB de la invención también se pueden utilizar en un ELISA de captura, por ejemplo, un ELISA de captura de IgM, tal como sigue. Se unen anticuerpos anti-IgM humana (por ejemplo, anticuerpos de cabra anti-IgM humana) a un soporte sólido, el soporte se pone en contacto con una muestra que se va a probar para la presencia de IgM humana contra el VHB, bajo condiciones que permitirían la unión de la IgM anti-VHB, si está presente, a uno o más de los anticuerpos anti-IgM humana unidos al soporte sólido, para formar complejos de anticuerpo /anticuerpo. Los HBsAg (por ejemplo, mutante y/o tipo salvaje) se añaden bajo condiciones que permitirían la unión a la IgM anti-VHB en los complejos de anticuerpo /anticuerpo formando un complejo de anticuerpo/anticuerpo/antígeno. Los antígenos no unidos se eliminan y se añaden anticuerpos anti-VHB marcados de forma detectable, producidos tal como se describe anteriormente, bajo condiciones que permiten la unión a los antígenos unidos. La presencia de IgM contra el VHB en la muestra se determina por la presencia de los anticuerpos anti-VHB marcados de forma detectable en los complejos unidos de Ab anti-IgM humana/IgM humana anti-VHB/antígeno unidos al soporte sólido.

Mientras que algunos de los formatos de ensayo precedentes se llaman ensayos "ELISA" (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas), será evidente para un experto en la materia que es posible la utilización de una marca detectable diferente de un resto de unión "ligado a enzima" y puede ser deseable en muchas situaciones. Otras marcas detectables adecuadas se describen en el presente documento y son bien conocidas en la materia.

Los ensayos también se pueden llevar a cabo en solución, tal que los antígenos o anticuerpos del VHB y los ligandos específicos contra estas moléculas forman complejos bajo condiciones de precipitación. En una realización particular, las moléculas se pueden unir a una partícula de fase sólida (por ejemplo, una perla de agarosa o similar), utilizando técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, tal como por acoplamiento químico directo o indirecto. La partícula recubierta, a continuación, se pone en contacto bajo condiciones adecuadas de unión con una muestra biológica que se sospecha que contiene anticuerpos o antígenos del VHB.

La reticulación entre los anticuerpos unidos provoca la formación de agregados complejos que se pueden precipitar y separar de la muestra utilizando lavado y/o centrifugación. La mezcla de reacción se puede analizar para determinar la presencia o ausencia de complejos utilizando cualquiera de varios métodos normales, tales como aquellos métodos inmunodiagnósticos descritos anteriormente.

5 En aún una realización adicional, se puede proporcionar una matriz de inmovilización, en la que, por ejemplo, una población policlonal de anticuerpos de una muestra biológica que se sospecha que contiene anticuerpos contra el VHB se inmoviliza en un sustrato. Se puede llevar a cabo una purificación por afinidad inicial de la muestra utilizando antígenos inmovilizados. La preparación resultante de la muestra, por lo tanto, contendrá sólo
10 restos anti-VHB, evitando potenciales propiedades de unión no específica en el soporte de afinidad. Se conocen en la técnica varios métodos de inmovilización de inmunoglobulinas (intactas o bien en fragmentos específicos) a un rendimiento alto y buena retención de actividad de unión a antígenos. Por ejemplo, se puede utilizar proteína A o proteína G para inmovilizar moléculas de inmunoglobulina al soporte sólido. Una vez que se han inmovilizado las moléculas de inmunoglobulina para proporcionar una matriz de inmovilización, se ponen en contacto
15 antígenos del VHB, tal como HBsAg, con los anticuerpos unidos bajo condiciones adecuadas de unión. Después de que se haya lavado cualquier antígeno de VHB unido no específicamente del soporte de inmovilización, se puede determinar la presencia de antígeno unido analizando la muestra utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se añade un anticuerpo marcado enzimáticamente que reacciona con el complejo de antígeno/anticuerpo unido, tal como un anticuerpo anti-HBsAg marcado, producido tal como se describe
20 anteriormente. Se utiliza un sustrato de enzima para generar una señal.

En otra realización de la invención, se utiliza un ensayo de inmunotransferencia en tira (SIA) para detectar antígenos del VHB en una muestra biológica. Por ejemplo, uno o más de los anticuerpos monoclonales de conejo descritos anteriormente, y opcionalmente anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra un HBsAg, se
25 pueden inmovilizar en la tira de prueba como reactivos de captura. Las técnicas de SIA son conocidas y combinan técnicas tradicionales de transferencia western y punto, por ejemplo, RIBA® (Chiron Corp., Emeryville, CA) SIA. En estos ensayos, los anticuerpos se inmovilizan como porciones discretas, individuales, por ejemplo, como bandas o puntos, en un soporte membranoso, o se pueden inmovilizar como una mezcla en una sola porción. De esta manera, el término "discretamente inmovilizado" en un soporte de membrana se refiere a que los anticuerpos están presentes como componentes separados y no mezclados, tal que se pueda evaluar la reactividad o carencia de la misma con cada uno de los reactivos de captura presentes. A continuación, se hace reaccionar una muestra biológica que se sospecha que contiene antígenos del VHB con la membrana de prueba. La visualización de la reactividad en la muestra biológica se puede lograr utilizando conjugados de anticuerpo anti-VHB-enzima junto con un sustrato colorimétrico de enzima. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales
35 de conejo descritos anteriormente se pueden utilizar para visualización de los complejos de anticuerpo-antígeno unidos. La tira de prueba para esta realización alternativa se puede preparar utilizando, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra HBsAg. El ensayo se puede llevar a cabo manualmente o utilizar en un formato automatizado.

40 Los soportes sólidos que se pueden utilizar en la práctica de los ensayos de inmunotransferencia en tira incluyen, pero no se limitan a, soportes de membrana derivados de varios polímeros primarios incluyendo celulosa, poliamida (nylon), poliacrilonitrilo, difluoruro de polivinilideno, polisulfona, polipropileno, poliéster, polietileno y resinas compuestas que comprenden combinaciones o derivados de los anteriores. Son particularmente preferentes los soportes derivados de celulosa, tales como membranas de nitrocelulosa, así como membranas de nylon. El sustrato incluye generalmente la membrana deseada con un respaldo de plástico inerte tal como un soporte.

Los reactivos de ensayo descritos anteriormente, incluyendo los anticuerpos monoclonales de conejo y/o los HBsAg descritos en el presente documento, los soportes sólidos con reactivos unidos, así como otros reactivos de detección, se pueden proporcionar en kits, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, para llevar a cabo los ensayos tal como se describen anteriormente. El kit también puede incluir formulaciones de control (positivas y/o negativas), reactivos marcados cuando el formato de ensayo requiere los mismos y reactivos de generación de señal (por ejemplo, sustratos de enzima) si la marca no genera una señal directamente. Las instrucciones (por ejemplo, escritas, en cinta, VCR, CD-ROM, etc.) para llevar a cabo el
50 ensayo habitualmente se incluirán en el kit. El kit también contendrá, dependiendo del ensayo particular utilizado, otros reactivos y materiales empaquetados (es decir, tampones de lavado y similares). Los ensayos normales, tal como aquellos descritos anteriormente, se puede llevar a cabo utilizando estos kits.

60 **III. Parte experimental**

A continuación, están los ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen sólo para propósitos ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera.

65 Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se permitirá algún error y desviación experimental.

Ejemplo 1Preparación de anticuerpos monoclonales de conejo

5 Para producir anticuerpos monoclonales que confieren inmunorreactividades suficientes a los varios mutantes de interés así como al HBsAg tipo salvaje, se inmunizaron tres conejos adultos hembra blancos Nueva Zelanda con antígenos HBsAg tipo salvaje (adw) y (ayw) (mostrado en las figuras 2A y 2B, respectivamente), seguido por refuerzos cada dos semanas con un cóctel de los antígenos tipo salvaje y cinco antígenos recombinantes principales de mutante de VHB, designados D1 (que tiene una substitución de A por F en la posición 134 de aminoácidos), D2 (que tiene una substitución de S por F en la posición 134 de aminoácidos), D3 (que tiene una substitución de R por G en el aminoácido 145), Y1 (que tiene una substitución de L por S en el aminoácido 143), e Y2 (que tiene una substitución de R por Q en el aminoácido 129 y una substitución de T por M en el aminoácido 133).

15 Las células B inmunitarias del bazo de los conejos más inmunorreactivos se fusionaron a células de plasmacitoma de conejo para producir hibridomas, esencialmente tal como se describe en Spieker-Polet y otros Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1995), 92:9348 - 9352. Brevemente, se fusionaron $1,5-3 \times 10^6$ linfocitos de un conejo inmunizado con un compañero de fusión derivado de una línea celular de plasmacitoma de conejo (por ejemplo, 240E 1-1-2, descrito en la Patente en los Estados Unidos No. 5.675.063; Spieker- Polet y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1995) 92:9348 - 9352) a una relación de 2:1 con PEG 4000 al 50% a 37°C en medio libre de suero. Las células se distribuyeron en placas de cultivo celular de 96 pocillos a aproximadamente 1×10^5 linfocitos por pocillo, en el medio con FBS al 15% (o FCS). Después de 48 horas, se añadió el medio HAT. El medio se cambió 2 - 3 veces antes del cribado. Habitualmente, las colonias de hibridomas están listas para el cribado en 3-5 semanas. Se probaron los sobrenadantes para la presencia de anticuerpo específico para el inmunógeno, por ELISA. Se utilizó inmunohistoquímica como un ensayo secundario de cribado. Los hibridomas se subclonaron por dilución límite. Para células alimentadoras, se utilizó el compañero de fusión a 2×10^4 células por pocillo.

30 Se cribaron un total de 3000 clones, y se identificaron 38 clones (tabla 1) como candidatos potenciales para estudio adicional. Estos clones, a continuación, se subclonaron y probaron para la producción de anticuerpos con la mejor reactividad contra todos los siete antígenos de superficie del VHB utilizados para el cóctel de antígenos, tanto mutantes como tipos salvajes (véase tabla 1). Los resultados indican que de los 38 clones evaluados, 4 clones (tal como se resalta en la tabla 1) tuvieron las inmunorreactividades más amplias a los mutantes de HBsAg. De esta manera, estos 4 hibridomas de conejo de VHB se pasaron a mayor escala, se purificaron y se evaluaron adicionalmente.

40 Después de análisis extensivos de los 38 clones de hibridoma de VHB seleccionados, dos clones, el 99S9 (No. de acceso ATCC PTA- 6014) y 99S6 (No. de acceso ATCC PTA 6015) , se demostró que producen anticuerpos con inmunorreactividades muy amplias contra el panel de mutantes de Ag de superficie del VHB. En particular, se utilizó un ELISA para comparar la inmunorreactividad de dos anticuerpos monoclonales de ratón, el mMAb1 y el mMAb2 (anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra HBsAg) y los anticuerpos monoclonales de conejo producidos por las líneas celulares de hibridoma 99S9 y 99S6 con los varios HBsAg mutantes descritos anteriormente. Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales de ratón y los anticuerpos monoclonales de conejo de los hibridomas 99S6 y 99S9 se probaron utilizando un sistema BIACORE 3000 (Biacore AB, Piscataway, NJ). Este sistema proporciona análisis de interacción biomolecular (BIA) en tiempo real utilizando tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR). Los biosensores basados en SPR monitorizan las interacciones midiendo la concentración másica de las biomoléculas cercanas a una superficie. La superficie se hace específica por la unión de uno de los compañeros de interacción. La muestra que contiene el (los) otro(s) compañero(s) fluye sobre la superficie. Cuando las moléculas de la muestra se unen al interactuante unido a la superficie, cambia la concentración local y se mide una respuesta de SPR. La respuesta es directamente proporcional a la masa de las moléculas que se unen a la superficie. En este caso, se inmovilizaron un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (para probar la inmunorreactividad de los anticuerpos monoclonales de conejo) o un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (para probar la inmunorreactividad de los anticuerpos monoclonales de ratón) en un chip sensor para proporcionar los anticuerpos de captura de superficie. Los anticuerpos monoclonales de conejo o ratón descritos anteriormente (ligandos), a continuación, fueron capturados por los anticuerpos de captura en superficie. Los HBsAg mutantes y tipo salvaje (analitos), a continuación, se pasaron a través de esta superficie y se detectaron las interacciones anticuerpo/antígeno y se midieron utilizando un dispositivo óptico BIACORE SPR.

60 Las figuras 3A-3D y la tabla 2 resumen los resultados del análisis BIACORE de los anticuerpos monoclonales de conejo de 99S6 (figura 3B) y 99S9 (figura 3D), en comparación con los anticuerpos de ratón mMAb1 (figura 3C) y mMAb2 (figura 3A). Para estos y los siguientes estudios, se utilizaron varios anticuerpos monoclonales de ratón a HBsAg diferentes (mMAb1, mMAB2, mMAB3, mMAB5 y mMAB6). También se utilizaron varios anticuerpos monoclonales de ratón comercialmente disponibles. Tal como se muestra en las figuras 3A-3D, en tanto que el anticuerpo monoclonal de ratón mMAB2 fue deficiente en la unión al mutante D3, y el mMAB1 fue

deficiente en la unión a los mutantes D3 y Y1, ambos clones de hibridoma de conejo 99S9 y 99S6 produjeron anticuerpos con actividades significativas de unión a los siete antígenos, incluyendo a D3 y Y1. Además, los resultados de BIACORE también evidenciaron que la unión de los anticuerpos monoclonales de conejo (de los clones de hibridoma 99S9 y 99S6) a los mutantes D3 e Y1 fue muy estable (figura 3). Estos resultados demostraron que los anticuerpos monoclonales de conejo de los clones 99S9 y 99S6 tuvieron inmunorreactividades más fuertes contra los antígenos mutantes D3 y Y1 reteniendo simultáneamente las inmunorreactividades para los otros antígenos, y de esta manera demostró que los anticuerpos de conejo tuvieron inmunorreactividades mucho más amplias para los varios mutantes de HBsAg en comparación con los dos anticuerpos monoclonales de ratón.

Para demostrar adicionalmente las ventajas de los anticuerpos monoclonales de conejo para la detección de variantes de HBsAg (es decir, mutantes), se probó el anticuerpo monoclonal de conejo de 99S9 en comparación con los anticuerpos monoclonales de ratón como el anticuerpo de captura o como el anticuerpo de detección en ensayos de ELISA sándwich para la detección de HBsAg tipo salvaje y variantes de HBsAg. En estos experimentos, se recubrieron dos conjuntos de placas de ELISA con solo anticuerpo monoclonal de ratón (99S9) o bien un cóctel de dos anticuerpos monoclonales de ratón anti-HBsAg, mMab2 y 160S11 (BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA). Estos dos conjuntos de placas de captura se aparearon con un sistema de detección de solo 99S9 peroxidasa de rábano (HRP), o se aparearon con un cóctel de anticuerpos monoclonales de ratón que comprendía una mezcla de 4 MAb anti-HBsAg marcados con HRP (mMab1, M01077 (Fitzgerald Industries International, Concord, MA), M01079 (Fitzgerald Industries International, Concord, MA) y mMab3).

Los resultados fueron consistentes con los resultados del estudio del análisis BIACORE. El anticuerpo monoclonal del conejo de 99S9 tenía inmunorreactividades más amplias en comparación con los anticuerpos monoclonales de ratón. Cuando el 99S9 se probó como el único anticuerpo de captura y de detección (99S9 como el anticuerpo de captura y HRP-99S9 como el anticuerpo de detección), fue capaz de detectar los 7 antígenos, mientras que los cócteles de anticuerpos monoclonales de ratón (mMab2/160SII como el anticuerpo de captura y HRP-mMab1/M77/M79/2D11 como el anticuerpo de detección) fallaron en detectar el antígeno D3 (tabla 3). Estos resultados mostraron que solo un anticuerpo monoclonal de conejo puede reemplazar de forma suficiente los múltiples anticuerpos monoclonales de ratón en los ensayos de ELISA utilizados para la detección de algunos mutantes de escape principales.

Para resumir los experimentos anteriores, el anticuerpo monoclonal de conejo 99S9 tuvo afinidad por los 7 antígenos probados y mostró disociaciones mucho más lentas para todos ellos, especialmente para D3 e Y1 (figura 3 y tabla 2). Aunque el mMab1 monoclonal de ratón pareció tener afinidad significativamente mayor para el mutante D1, D2 y los tipos salvajes adw y ayw, fue incapaz de unirse a los antígenos mutantes D3 y Y1 (figura 3 y tabla 2). El anticuerpo monoclonal de ratón mMab2 tenía afinidades globales menores para la mayoría de los antígenos mutantes del VHB y fue incapaz de unirse al antígeno mutante D3 (figura 3 y tabla 2). El anticuerpo monoclonal de conejo 99S9 solo, fue suficiente para reemplazar las combinaciones de múltiples anticuerpos monoclonales de ratón para la captura y/o detección más efectiva del mutante D3 (tabla 3).

Para probar la capacidad de los anticuerpos monoclonales de conejo para detectar otras variantes de HBsAg, se llevaron a cabo ELISA adicionales utilizando sólo anticuerpos monoclonales de ratón contra HBsAg (ELISA de mMab) o bien una combinación de anticuerpos monoclonales de ratón y anticuerpos monoclonales de conejo contra HBsAg (ELISA de rMab). Para la ELISA de mMab, se utilizaron 5 anticuerpos monoclonales de ratón anti-HBsAg diferentes, 2 para la captura (mMab2 y mMab4) y 3 para la detección (mMab1, mMab5 y mMab6). Para el ELISA de rMab, se reemplazaron dos de los anticuerpos monoclonales de ratón utilizados para la detección (mMab5 y mMab6) por un solo anticuerpo monoclonal de conejo (99S9). Los anticuerpos de captura se biotinizaron e inmovilizaron en pocillos recubiertos con estreptavidina. Los anticuerpos de detección se conjugaron con peroxidasa de rábano (HRP). La tabla 4 muestra los resultados con varias variantes de HBsAg. El ELISA de rMab detectó todas las variantes que se detectaron en el ELISA de mMab, y adicionalmente, detectó 2 variantes que no se detectaron en el ELISA de mMab, la variante P120Q y la variante P142S. De esta manera, el ELISA que utiliza el anticuerpo monoclonal de conejo (99S9) fue capaz de detectar más variantes de HBsAg utilizando menos anticuerpos que el ELISA que utilizó sólo los anticuerpos monoclonales de conejo.

Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales de conejo proporcionan una herramienta poderosa para una mejor detección de antígenos de variantes del VHB.

De esta manera, se dan a conocer nuevos anticuerpos monoclonales y métodos para detectar infección por el VHB.

Tabla 1

ID	Antígenos de mutantes del HBV					Antígenos de VHB de de tipo silvestre	
	D1	D2	D3	Y1	Y2	ADW	AYW
27S-2	2,95	2,96	2,75	0,70	1,06	3,30	0,75
64S1	0,14	0,13	0,07	0,00	0,00	0,10	0,00
64S2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
64S3	0,05	0,04	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00
64S4	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
71S1	2,24	1,90	1,40	0,05	0,06	1,70	0,07
71S4	3,07	2,90	2,70	0,21	0,22	2,80	0,24
71S5	3,38	3,40	3,20	0,29	0,35	3,00	0,35
71S7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
71S8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
71S12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
71S14	3,06	0,00	3,20	0,32	0,32	3,00	0,34
71S15	2,93	3,10	3,00	0,28	0,26	2,70	0,30
71S16	3,13	3,00	2,98	0,32	0,35	3,30	0,40
71S17	3,33	3,30	2,77	0,38	0,48	3,00	0,53
96S1	3,45	3,40	2,87	3,10	3,30	2,70	2,92

Tabla 1 (continuación)

ID	Antígenos de mutantes del HBV					Antígenos de VHB de tipo silvestre	
	D1	D2	D3	Y1	Y2	ADW	AYW
99S1	3,37	2,80	2,90	1,40	1,50	2,90	1,70
99S4	2,78	2,70	2,40	0,73	0,80	3,00	1,20
99S6	3,01	3,20	2,60	1,05	1,20	3,30	1,45
99S7	2,21	1,99	1,80	0,40	0,54	2,40	0,78
99S8	2,58	2,30	2,30	0,60	0,66	2,70	0,90
99S9	3,62	2,80	2,80	1,40	1,40	2,80	1,68
99S10	2,50	2,40	2,30	0,80	0,90	2,50	1,06
116S1	3,20	3,30	0,00	2,50	2,40	2,30	2,80
116S2	2,30	1,90	0,01	1,70	1,60	2,44	1,99
116S3	2,70	2,60	0,00	2,40	1,98	2,60	2,70
116S4	2,80	2,60	0,00	2,20	1,87	2,80	2,45
116S5	1,90	1,70	0,00	1,60	1,30	2,01	2,03
121S2	3,07	2,96	2,90	0,33	0,00	3,07	2,40
121S4	3,70	3,10	2,90	0,36	0,00	3,20	2,60
121S5	3,01	2,70	2,90	0,31	0,00	2,80	2,10
121S6	3,70	3,40	2,80	0,42	0,00	3,10	2,60
121S8	2,80	3,00	3,00	1,48	0,10	2,90	2,70
121S9	3,20	3,20	2,90	0,27	0,06	2,90	1,80
123S3	1,65	2,10	0,01	0,00	1,70	0,00	0,00
123S4	1,45	1,70	0,01	0,00	1,40	0,00	0,00
123S8	1,00	1,30	0,00	0,02	1,10	0,00	0,00
123S12	1,05	1,40	0,00	0,02	1,10	0,00	0,00

Captura: las placas de ELISA se recubrieron con los 7 antígenos diferentes

Tamaño de muestra: 200 µl (dilución 1:100 de cultivo celular en el diluyente del espécimen)

Detección: Conjugado de cabra anti-conejo (fab)' 2-HRP

tabla 2

		ELISA	BIACORE			
			mAb de ratón		mAb de conejo	
Recombinante de VHB	Sitio de la mutación	mMAb2 /mMAb1	(mMAb1)	(mMAb2)	(99S6)	(99S9)
D1	F134A	++	+++++	+	++	+
D2	F134S	++	+++++	++	++	+
D3	G145R	(-, +/-, -)	- o +/-	-	+	+
Y1	S143L	(-, -)	-	+	+	+
Y2	129Q/133T	+++	Sin resultado	Sin resultado	Sin resultado	Sin resultado
VHB de tipo salvaje	Sitio de la mutación	mMAb2/ mMAb1	(mMAb1)	(mMAb2)	(99S6)	(99S9)
adw		+++	+++++	++	+	++
ayw		+	+++++	+	+	+

ES 2 488 849 T3

Tabla 3

Captura:		2 MnAbs de ratón, mMab2/160S11		1 MnAb de conejo 99S9	
Detección	4 MnAbs de ratón mMab1/M77/M79/mMab3	1 MnAb de conejo 99S9-HRP	4 MnAb de de ratón mMab1/M77 /M79/mMab3	1 MnAb de conejo 99S9-HRP	
Muestras de prueba	OD	OD	OD	OD	
Adw (3 ng/prueba)	2,84	0,73	2,45	0,53	
Ayw (3 ng/prueba)	2,64	0,31	2,67	0,31	
D1 (3 ng/prueba)	2,35	0,56	2,02	0,37	
D2 (3 ng/prueba)	1,90	0,56	1,69	0,46	
D3 (3 ng/prueba)	0,02	0,08	0,01	0,05	
Y1 (3 ng/prueba)	0,87	0,31	0,81	0,21	
Y2 (3 ng/prueba)	1,69	0,32	1,25	0,20	
P120Q (A) (3 ng/prueba)	1,65	0,17	1,00	0,07	
Corte	0,07	0,09	0,01	0,03	
Muestras de prueba	S/C	S/C	S/C	S/C	
adw (3 ng/prueba)	40,6	8,1	244,5	17,8	
ayw (3 ng/prueba)	38,2	3,5	266,7	10,2	
D1 (3 ng/prueba)	33,6	6,2	201,9	12,2	
D2 (3 ng/prueba)	27,2	6,2	168,8	15,2	
D3 (3 ng/prueba)	0,3	0,9	0,9	1,8	
Y1 (3 ng/prueba)	12,4	3,3	80,6	7,0	
Y2 (3 ng/prueba)	24,1	3,5	125,3	6,6	
P120Q (A) (3 ng/prueba)	23,6	1,9	99,7	2,3	
<p>Captura 1: 99S9 monoclonal de conejo Captura 2: monoclonales de ratón mMab2, 160S11</p> <p>Detección 1: mMnAb-HRP (mMab1, M01077, M01079, mMab3) Detección 2: MnAb de conejo-HRP 99S9</p>					

Tabla 4

Muestra	Ensayo de MAb de ratón	Ensayo de MAb de conejo
Control positivo	127,15	143,06
Control negativo	3,34	4,42
adw 0,5 ng/ml	327,62	334,99
ayw 0,5 ng/ml	299,61	302,06
G145R 1 ng/ml	167,36	145,65
S143L 1 ng/ml	33,59	39,67
P120Q 1 ng/ml	33,06	68,81
P142L 0,2 ng/ml	21,01	35,77
D144A 0,2 ng/ml	48,40	37,54
F134S 0,2 ng/ml	85,83	88,22
F134A 0,2 ng/ml	140,45	145,80
Y118K 1:9000	26,83	28,68
Y118S 1:9000	46,65	49,10
Y131A 1:9000	85,89	86,72
T126N (Limpio)	156,28	166,39
Q129H (Limpio)	222,93	291,02
M133D (Limpio)	51,13	66,07
P142S (Dil 1:10)	41,48	223,58
D144N (Dil 1:600)	61,55	81,05

Depósitos de cepas útiles en la práctica de la invención

5

10

15

Se hizo un depósito de cultivos biológicamente puros de las siguientes cepas en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA. El número de acceso indicado se asignó después de la prueba exitosa de viabilidad, y se pagaron las tasas necesarias. Los depósitos se hicieron según las provisiones del tratado de Budapest en el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patente y las normativas del mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de cultivos viables durante un periodo de treinta años (30) desde la fecha de depósito y, como mínimo, cinco (5) años después de la petición más reciente para proporcionar una muestra del depósito por parte del depositario. Los organismos estarán disponibles en la ATCC según los términos del tratado de Budapest, que asume disponibilidad permanente y no restringida de los cultivos a un individuo determinado por el Comisionado Norteamericano de Patentes y Marcas para estar facultado al mismo de acuerdo con 35 U.S.C. § 122 y las reglas del Comisionado conforme al mismo (incluyendo 37 C. F. R. §1.12). Tras la concesión de una patente, se eliminarán irrevocablemente todas las restricciones de la disponibilidad al público de los cultivos depositados.

5 Estos depósitos son proporcionados simplemente como conveniencia para aquellos expertos en la materia, y no son una admisión de que se requiera un depósito de acuerdo con 35 U.S.C § 122. Las secuencias de ácido nucleico de estos plásmidos, así como las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados por los mismos, se incorporan en el presente documento por referencia y son de control en el caso de cualquier conflicto con la descripción del presente documento. Se puede requerir una licencia para llevar a cabo, utilizar o vender los materiales depositados, y no se otorga tal licencia en el presente documento.

	<u>Hibridoma</u>	<u>Fecha de depósito</u>	<u>ATCC No.</u>
10	99S6 (CMCC # 12337)	26 de mayo de 2004	PTA-6015
	99S9 (CMCC # 12336)	26 de mayo de 2004	PTA-6014

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Chiron Corporation

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES DE CONEJO CONTRA ANTÍGENOS DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN DE LOS MISMOS

<130> 2300-22665.40

<150> 60/577,561

<151> 2004-06-07

<150> 60/583,734

<151> 2004-06-28

<160> 5.

<170> Versión 3.3 de PatentIn.

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> determinante "a" de HBsAg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Lys o Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa = Thr o Met

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa = Ile o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa = Pro o Thr

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9) .. (9)
 <223> Xaa = Gln o Arg

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11) .. (11)
 <223> Xaa = Thr o Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa = Met, Lys o Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14) .. (14)
 <223> Xaa = Phe, Ala, o Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23) ..(23)
 <223> Xaa = Ser o Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25) .. (25)
 <223> Xaa = Gly o Arg

<400> 1

Cys Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Pro Ser
 1 5 10 15

Cys Cys Cys Thr Lys Pro Xaa Asp Xaa Asn Cys
 20 25

<210> 2
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos para el antígeno sAg de adw de tipo salvaje

<400> 2

ES 2 488 849 T3

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
 1 5 10 15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
 20 25 30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys
 35 40 45

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
 50 55 60

Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
 65 70 75 80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
 85 90 95

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
 100 105 110

Thr Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala
 115 120 125

Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
 130 135 140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys
 145 150 155 160

Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
 165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
 180 185 190

Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
 195 200 205

Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
 210 215 220

Tyr Ile
 225

ES 2 488 849 T3

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos para el antígeno sAg de ayw de tipo salvaje

<400> 3

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1 5 10 15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20 25 30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
35 40 45

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
50 55 60

ES 2 488 849 T3

Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 70 75 80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
85 90 95

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
100 105 110

Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
130 135 140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
145 150 155 160

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
180 185 190

Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
195 200 205

Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
210 215 220

Tyr Ile
225

<210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> determinante "a" de tipo salvaje de adw

<400> 4

Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys
1 5 10 15

Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys
20

REIVINDICACIONES

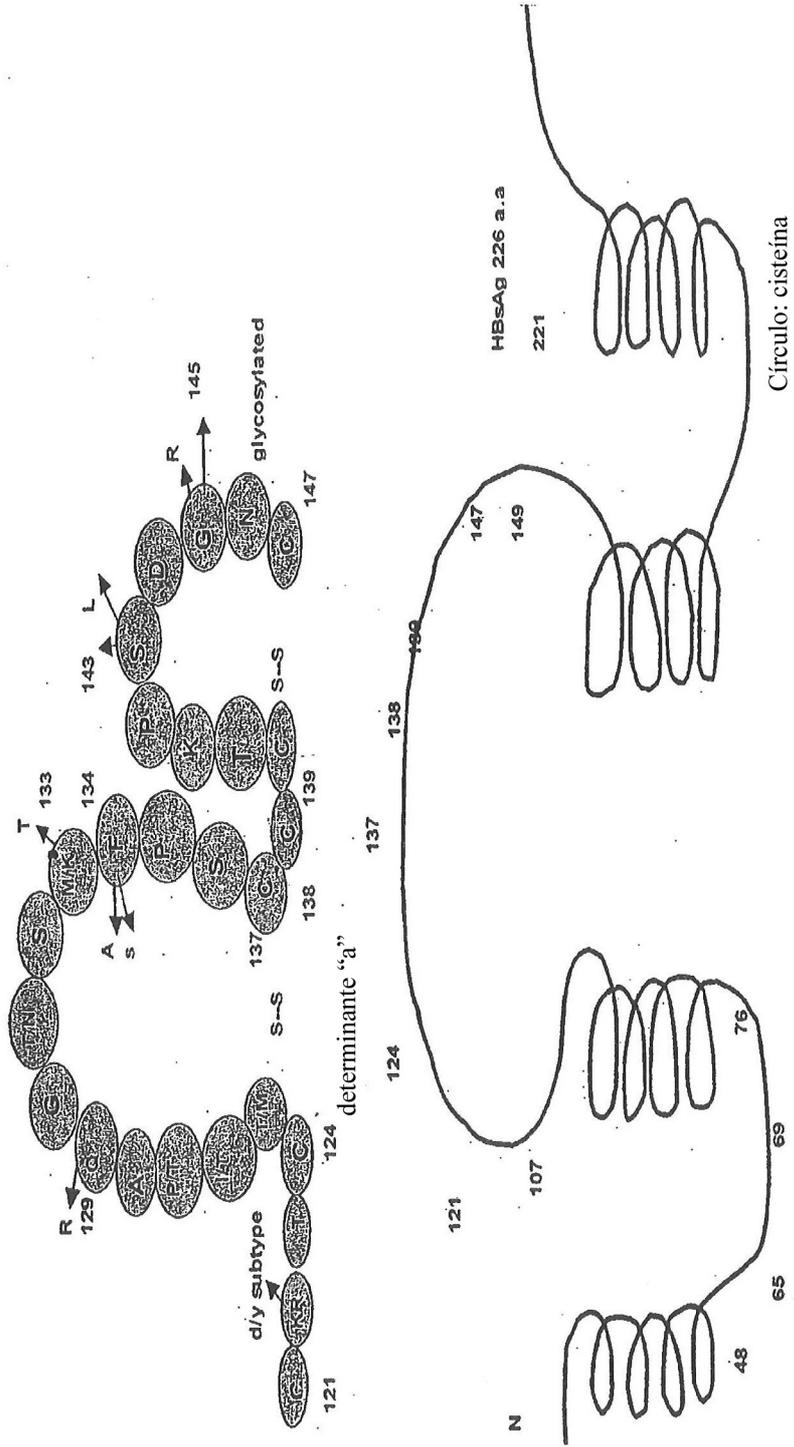
- 5 1. Anticuerpo monoclonal de conejo contra el virus de la hepatitis B (VHB), o un fragmento inmunorreactivo del mismo, que reconoce los mutantes de antígenos de superficie de la hepatitis B de (HBsAg) F134A, F134S, G145R, S143L, P142S y Q129R/M133T.
2. Anticuerpo monoclonal de conejo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo también reconoce un HBsAg de tipo salvaje.
- 10 3. Anticuerpo monoclonal de conejo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo se produce utilizando:
 - a. un hibridoma de conejo-conejo, o
 - b. un hibridoma de conejo-ratón.
- 15 4. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo:
 - a. es producido por el hibridoma 99S6, número de acceso ATCC PTA-6015.
 - b. es producido por el hibridoma 99S9, número de acceso ATCC PTA-6014, o
 - c. reconoce el mismo epitopo que un anticuerpo producido por el hibridoma 99S6, número de acceso ATCC PTA-6015 o 99S6 número de acceso ATCC PTA-6014.
- 20 5. Fragmento, según la reivindicación 1, en el que el fragmento es un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o sFv.
6. Hibridoma que produce el anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que el hibridoma es:
 - a. hibridoma 99S6, número de acceso ATCC PTA-6015, o
 - b. hibridoma, 99S9, número de acceso ATCC PTA-6014.
- 25 7. Método para detectar antígenos de superficie del VHB en una muestra biológica, que comprende:
 - (a) poner en contacto dicha muestra biológica con, como mínimo, un anticuerpo monoclonal de conejo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, bajo condiciones que permitan a los antígenos del VHB, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse al anticuerpo para formar un complejo de anticuerpo/antígeno; y
 - (b) detectar la presencia o ausencia de dicho complejo de anticuerpo/antígeno, detectando de esta manera la presencia o ausencia de antígenos de superficie del VHB en dicha muestra.
- 30 8. Método, según la reivindicación 7, en el que dicho, como mínimo, un anticuerpo monoclonal de conejo se marca de forma detectable.
- 35 9. Método, según la reivindicación 7, en el que el método comprende además hacer reaccionar dicha muestra biológica con uno o más anticuerpos adicionales dirigidos contra un HBsAg tipo salvaje o un mutante de HBsAg con una mutación en la región determinante "a".
- 40 10. Kit de prueba inmunodiagnóstico, para detectar infección por VHB, dicho kit de prueba que comprende:
 - a. como mínimo, un anticuerpo monoclonal de conejo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o
 - b. un soporte sólido que comprende, como mínimo, un anticuerpo monoclonal de conejo o un fragmento inmunorreactivo del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 45 11. Soporte sólido que comprende, como mínimo, un anticuerpo monoclonal de conejo o un fragmento inmunorreactivo del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 50 12. Kit de prueba inmunodiagnóstico, según la reivindicación 10, o soporte sólido, según la reivindicación 11, en el que el kit de prueba o el soporte comprenden además uno o más anticuerpos adicionales dirigidos contra un HBsAg tipo salvaje o un mutante de HBsAg con una mutación en la región determinante "a".
- 55 13. Método, según la reivindicación 9, kit de prueba inmunodiagnóstico, según la reivindicación 12, o soporte sólido, según la reivindicación 12, en el que los uno o más anticuerpos adicionales comprenden un anticuerpo monoclonal adicional.
- 60 14. Método, kit de prueba inmunodiagnóstico o soporte sólido, según la reivindicación 13, caracterizados porque los uno o más anticuerpos adicionales comprenden un anticuerpo monoclonal de ratón.
- 65 15. Soporte sólido, según la reivindicación 11, que comprende además, como mínimo, dos controles internos, caracterizados porque uno de los controles define el límite inferior de detección para un resultado positivo en un inmunoensayo que utiliza el soporte sólido y el otro control define un resultado altamente positivo en un inmunoensayo que utiliza el soporte sólido.
16. Soporte sólido, según la reivindicación 11, en el que el soporte sólido es una tira de nitrocelulosa.

- 5 17. Método para detectar la presencia de antígenos de superficie del VHB en una muestra biológica, dicho método que comprende: (a) proporcionar una muestra biológica; (b) proporcionar un soporte sólido, según cualquiera de las reivindicaciones 11-16; (c) poner en contacto dicha muestra biológica con dicho soporte sólido, bajo condiciones que permitan que los antígenos de superficie del VHB, si están presentes en la muestra biológica, se unan con, como mínimo, uno de los anticuerpos monoclonales de conejo, según las reivindicaciones 1-5, para formar un complejo de anticuerpo/antígeno; y (d) detectar la presencia del complejo de anticuerpo/antígeno, detectando de esta manera la presencia de antígenos de superficie del VHB en la muestra biológica.
- 10 18. Método, según la reivindicación 17, que además comprende: (e) eliminar los antígenos de VHB no unidos; (f) proporcionar uno o más restos capaces de asociarse con dicho complejo de anticuerpo/antígeno; y (g) detectar la presencia de dichos uno o más restos, detectando de esta manera la presencia de antígenos de superficie del VHB en la muestra biológica.
- 15 19. Método, según la reivindicación 18, en el que dicho uno o más restos comprende un anticuerpo contra el VHB marcado de forma detectable.
- 20 20. Método, según la reivindicación 19, en el que el anticuerpo contra el VHB marcado de forma detectable es un anticuerpo monoclonal de conejo que reconoce un mutante de HBsAg con una mutación en la región determinante "a", o un fragmento inmunorreactivo del mismo.
21. Método, según la reivindicación 8 ó 19, en el que la marca detectable es una enzima.
- 25 22. Método, según la reivindicación 7, en el que la muestra biológica es de una muestra sanguínea humana.
- 30 23. Método para detectar la presencia de anticuerpos anti-HBsAg en una muestra biológica, dicho método que comprende: (a) proporcionar un soporte sólido, según cualquiera de las reivindicaciones 11-16; (b) poner en contacto dicho soporte sólido con uno o más HBsAgs, bajo condiciones que permitan que los uno o más HBsAgs se unan con, como mínimo, uno de los anticuerpos monoclonales de conejo, según las reivindicaciones 1-5, para formar un complejo de anticuerpo/antígeno; (d) poner en contacto dicho soporte sólido que tiene el complejo de anticuerpo/antígeno con una muestra biológica, bajo condiciones que permitan que los anticuerpos de anti-HBsAg, si están presentes en la muestra biológica, se unan al complejo de anticuerpo/antígeno para formar un complejo de anticuerpo/antígeno/anticuerpo; y (e) detectar la presencia del complejo de anticuerpo/antígeno/anticuerpo, detectando de esta manera la presencia de anticuerpos anti-HBsAg en la muestra biológica.
- 35 24. Método, según la reivindicación 23, que además comprende: (f) eliminar los anticuerpos no unidos; (g) proporcionar uno o más restos capaces de asociarse con dicho complejo de anticuerpo/antígeno/anticuerpo; y (h) detectar la presencia de dicho uno o más restos, detectando de esta manera la presencia de anticuerpos anti-HBsAg de la muestra biológica.
- 40 25. Método, según la reivindicación 24, en el que dicho uno o más restos comprende una molécula de inmunoglobulina marcada de forma detectable.
- 45 26. Método para preparar un suministro sanguíneo que comprende sangre entera, plaquetas, plasma o suero, sustancialmente libre de VHB, que comprende: (a) cribar alícuotas de sangre entera, plaquetas, plasma o suero de las muestras sanguíneas recolectadas, según el método de la reivindicación 22 o la reivindicación 23; (b) eliminar cualquier muestra en la que se detecte un antígeno de VHB; (c) combinar las muestras en las que no se detecte antígeno del VHB para proporcionar un suministro sanguíneo sustancialmente libre de VHB.
- 50 27. Método para cribar un tejido u órgano donado antes del trasplante para proporcionar un tejido u órgano sustancialmente libre de VHB, que comprende: (a) cribar una muestra de dicho tejido u órgano por el método según la reivindicación 7 o la reivindicación 23; (b) eliminar un tejido u órgano en el que se detecte un antígeno del VHB para proporcionar un tejido u órgano sustancialmente libre de VHB.
- 55 28. Método para preparar un anticuerpo monoclonal de conejo anti-VHB, dicho método que comprende: (a) inmunizar un conejo con un mutante de HBsAg con una mutación en la región determinante "a", en el que el mutante de HBsAg comprende la secuencia de la región determinante "a" de F134A, F134S, G145R, S143L, P142S o Q129R/M133T; (b) fusionar células que producen anticuerpos contra el mutante de HBsAg de dicho conejo con una célula de una línea celular inmortalizada para producir un hibridoma; (c) seleccionar dicho hibridoma; (d) cultivar dicho hibridoma seleccionado; y (e) recolectar el anticuerpo secretado por dicho hibridoma cultivado.
- 60 29. Método, según la reivindicación 28, en el que el paso de inmunización comprende inmunizar un conejo con más de un mutante de HBsAg.
- 65

30. Método, según la reivindicación 28, en el que dichas células productoras de anticuerpo son esplenocitos de conejo.
- 5 31. Método, según la reivindicación 30, en el que dichos esplenocitos se fusionan con una célula de una línea celular inmortalizada de conejo para producir un hibridoma de conejo-conejo.
32. Método, según la reivindicación 31, en el que la línea celular inmortalizada de conejo es un plasmacitoma de conejo.
- 10 33. Método, según la reivindicación 31, en el que dichos esplenocitos se fusionan con una célula de una línea celular inmortalizada de ratón para producir un hibridoma de conejo-ratón.
34. Método, según la reivindicación 26, en el que el conejo se inmuniza con, como mínimo, dos mutantes de HBsAg seleccionados del grupo que comprende F134A, F134S, G145R, S143L, P142S o Q129R/M133T.
- 15 35. Método, según la reivindicación 26, en el que el conejo se inmuniza con los mutantes de HBsAg F134A, F134S, G145R, S143L, P142S y Q129R/M133T.
- 20 36. Método, según la reivindicación 26, en el que el conejo se inmuniza adicionalmente con un HBsAg tipo salvaje.
37. Método para preparar un hibridoma de conejo-conejo, según la reivindicación 6, que comprende: (a) inmunizar un conejo con un mutante de HBsAg con una mutación de la región determinante "a", en el que el mutante de HBsAg comprende la secuencia de la región determinante "a" de F134A, F134S, G145R, S143L y Q129R/M133T; (b) fusionar esplenocitos que producen anticuerpos contra el mutante de HBsAg del conejo con células de un plasmacitoma de conejo; (c) seleccionar células que secreten dichos anticuerpos.
- 25 38. Polinucleótido, que codifica para un anticuerpo monoclonal de conejo o un fragmento inmunorreactivo del mismo, según la reivindicación 1.
- 30 39. Polinucleótido, según la reivindicación 38, en el que el fragmento inmunorreactivo codificado por el polinucleótido es un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o un sFv.
- 35 40. Utilización de un anticuerpo monoclonal de conejo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en un método para detectar antígenos de superficie del VHB en una muestra biológica.
41. Utilización de un soporte sólido, según cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en un método para detectar la presencia de antígenos de superficie del VHB y/o anticuerpos contra HBsAg en una muestra biológica.
- 40 42. Utilización de un anticuerpo monoclonal de conejo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en un método para preparar un suministro sanguíneo que comprende sangre entera, plaquetas, plasma o suero, sustancialmente libre de VHB.
- 45 43. Utilización de un anticuerpo monoclonal de conejo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en un método para cribar un tejido u órgano donado antes del trasplante para proporcionar un tejido u órgano sustancialmente libre de VHB.

FIG. 1 (SEQ ID NO: 1)

Sitios Mutantes del Determinante "a" de HBsAg



ES 2 488 849 T3

ADW TIPO SALVAJE

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNSHSPTSCPP 67
ICPGYRWMCLRRFIIIFLIFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMF 134
PSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYW 201
GPSLYSIVSPFIPLLPIFFCLWVYI 226

A (SEQ ID NO:2)

AYW TIPO SALVAJE

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNSHSPTSCPP 67
TCPGYRWMCLRRFIIIFLIFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMY 134
PSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYW 201
GPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI 226

B (SEQ ID NO:3)

FIGURA 2

FIGURA 3A

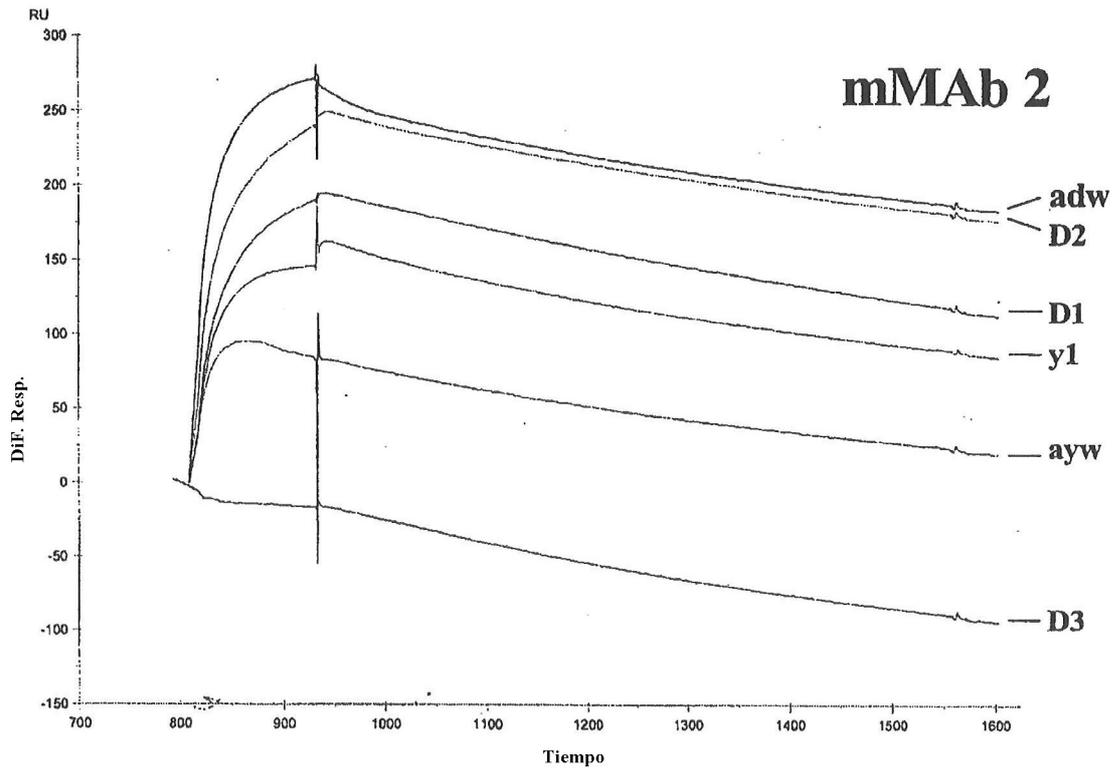


FIGURA 3B

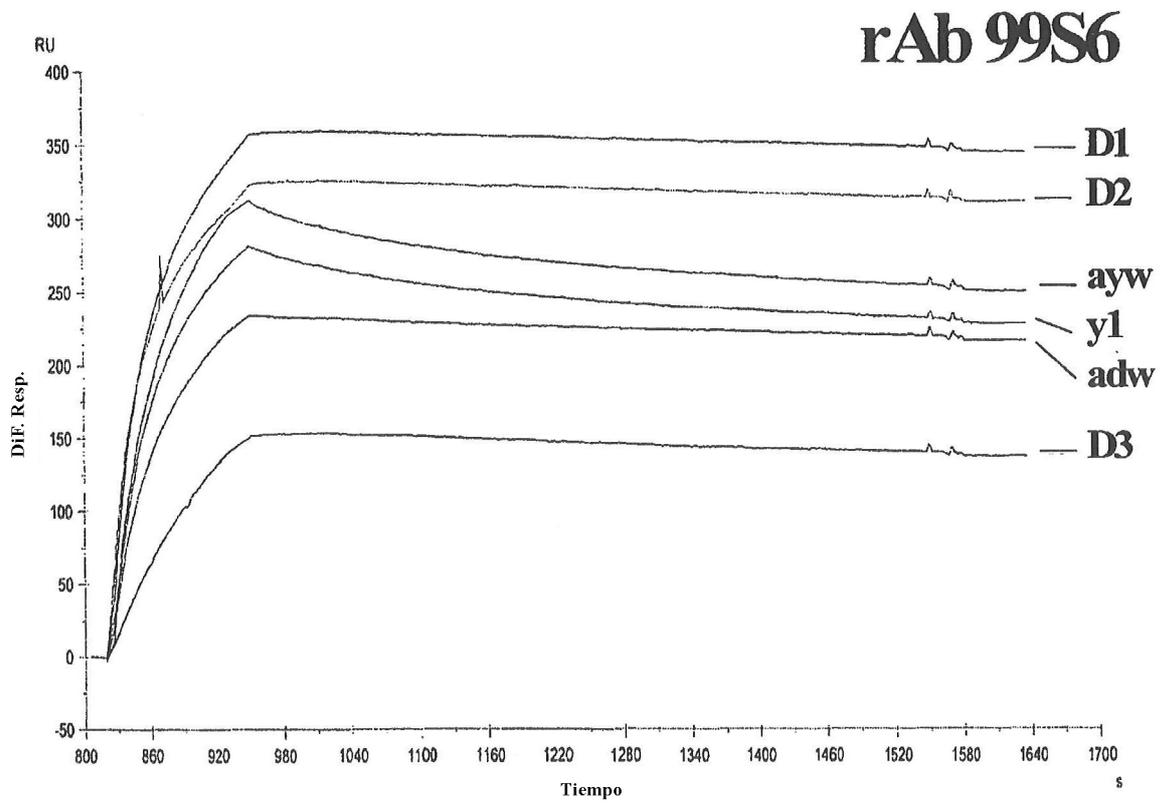


FIGURA 3C

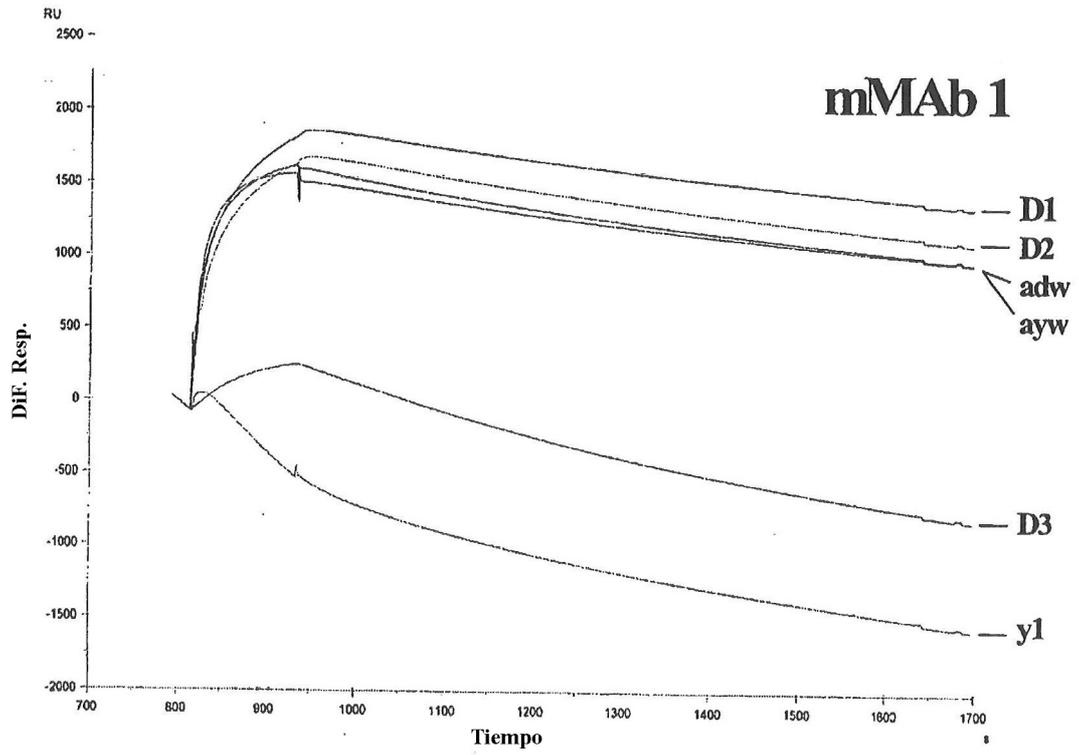


FIGURA 3D

