

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 203**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/576** (2006.01)

**C07K 16/08** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**G01N 33/577** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2007 PCT/JP2007/071150**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2008 WO08053901**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2007 E 07830884 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2088431**

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

30 Prioridad:

**30.10.2006 JP 2006294906**

**18.05.2007 JP 2007133539**

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

**15.11.2017**

73 Titular/es:

**ADVANCED LIFE SCIENCE INSTITUTE, INC.**

**(100.0%)**

**51, Komiyamachi, Hachioji-shi**

**Tokyo 192-0031, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUBARA, NAOKO;**

**SUGAMATA, YASUHIRO;**

**KUSANO, OSAMU y**

**SHIRATA, NORIKO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 642 203 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para analizar el antígeno s del virus de la hepatitis B

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para determinar el antígeno superficial del virus de la hepatitis B, particularmente mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que se une al antígeno superficial del virus de la hepatitis B. De acuerdo con la presente invención, el antígeno superficial del virus de la hepatitis B (este puede referirse en lo sucesivo como antígeno HBs) en una muestra de prueba (esta puede referirse en lo sucesivo como muestra) puede ensayarse con exactitud mediante la medición del antígeno HBs usando una sonda que se une al primer péptido de la región interna del antígeno HBs y una sonda que se une a un segundo péptido de la región externa del antígeno, cuyas sondas son especialmente anticuerpos monoclonales.

15 **Antecedentes de la técnica**

La sangre que se usa en transfusiones a menudo causa una infección postransfusión. El virus de la hepatitis B (este puede referirse en lo sucesivo como VHB) es un virus causativo de hepatitis postransfusión, que infecta a través de la transfusión en una cirugía o similar. Por lo tanto, resulta extremadamente importante diagnosticar si la sangre está o no está infectada por VHB mediante una selección de la sangre a transfundir. Se usa ampliamente como método para diagnosticar tal infección de VHB, un método para determinar el antígeno HBs, en cuyo antígeno HBs se detecta y cuantifica.

El antígeno HBs es una proteína de la envoltura estructural importante sobre la superficie de una partícula de VHB infecciosa y que está contenida en la membrana bicapa lipídica derivada a partir de células hepáticas, cuya membrana envuelve la partícula nuclear que contiene ADN-VHB. La sangre de un paciente infectado por VHB también contiene pequeñas partículas esféricas no infecciosas y partículas tubulares que no tienen la partícula nuclear y que están compuestos del antígeno HBs. Las pequeñas partículas esféricas existen en la sangre de forma más abundante y se observan en relaciones de aproximadamente 1.000 pequeñas partículas esféricas respecto a 1 a varias partículas de VHB. Los reactivos de diagnóstico actualmente disponibles para el antígeno HBs detectan principalmente el antígeno HBs en forma de la pequeña partícula esférica.

El antígeno HBs es una proteína de membrana que tiene la longitud total de 226 restos de aminoácidos, que penetra la membrana bicapa lipídica 4 veces. Aunque el modelo para la estructura de la transmembrana del antígeno HBs aún no se ha elucidado completamente, Howard y col. propusieron que el antígeno HBs está formado por: la primera región externa (lado del lumen del ER) de la membrana bicapa lipídica, que consiste en restos del antígeno HBs del extremo N que se encuentran entre la posición 1 y la posición 11; consistiendo la primera región de la transmembrana en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 12 y la posición 28, que penetra la membrana bicapa lipídica y es hidrófoba; la primera región interna de la membrana bicapa lipídica, que consiste en restos que se encuentran entre la posición 29 y la posición 80; la segunda región de la transmembrana que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 81 y la posición 97, que es hidrófoba; la segunda región externa (lumen del ER) que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 98 y la posición 156, que es hidrofílica; y la tercera región de la transmembrana, la segunda región interna, la cuarta región de la transmembrana y la tercera región externa (lumen del ER) que consiste en el resto de aminoácidos que se encuentra en la posición 157 y restos más distantes del extremo N (bibliografía no de patente 1: Fig. 1).

Como el método convencional para analizar el antígeno HBs, han sido comunes los métodos que usan un anticuerpo que se une al determinante antigénico común de un antígeno HBs. El determinante antigénico común de un antígeno HBs se ubica sobre el péptido que consiste en los restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 110 y la posición 156 en la segunda región externa (lumen del ER) del antígeno HBs, es decir, los restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 98 y la posición 156. El determinante antigénico común a tiene una gran estructura dimensional compleja y, además, se informa que tiene cuatro epítopos (bibliografía no de patente 2).

Por otra parte, el método anterior para analizar el antígeno HBs usando un anticuerpo que se une al determinante antigénico común a es a veces incapaz de detectar VHB que tenga mutación(es) de aminoácidos en la región del antígeno HBs. Por lo tanto, recientemente se ha desarrollado un método para analizar antígeno HBs usando un anticuerpo que se une al péptido en la primera región interna de la bicapa lipídica, cuyo péptido consiste en restos de aminoácidos que se encuentran en la posición 26 y la posición 80 (bibliografía de patente 1).

60 Bibliografía de patente 1 WO 2006/033368  
 Bibliografía no de patente 1: Howard et al. "Viral Hepatitis and Liver Disease" (Zuckerman AJ and Alan R (eds.)) (Liss Inc, Nueva York) 1988, págs. 1094-1101  
 Bibliografía no de patente 2: Hiroaki Okamoto "Nippon Rinsho, Molecular Hepatitis Virology, Fundamental-Clinic-Prophylaxis, Lower Volume, Hepatitis A, B, D, E Viruses", publicado el 26 de octubre de 1995, págs. 212-222

65

## Descripción de la Invención

### Problemas a resolver con la invención

- 5 En un paciente gravemente infectado por VHB, el antígeno HBs es positivo en la fase inicial de la infección y, posteriormente, el anticuerpo HBs se vuelve positivo y el antígeno HBs se vuelve negativo. Se descubrió que, cuando el anticuerpo HBs en la sangre de un paciente es positivo y el antígeno HBs se analiza mediante un método que usa un anticuerpo que se une al determinante antigénico común a, el anticuerpo HBs del paciente inhibe la unión del anticuerpo usado en el método de análisis al antígeno HBs, de modo que el valor medido disminuye.
- 10 Además, cuando se analizó el antígeno HBs mediante un método para analizar antígeno HBs usando un anticuerpo que se une al péptido en la primera región interna de la capa bilipídica, cuyo péptido consiste en los restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 26 y la posición 80, se descubrió que existen muestras de falso negativo que no pueden analizarse a pesar de la existencia del virus en la sangre.
- 15 Los presente inventores estudiaron exhaustivamente en un intento para conseguir cuantificar con exactitud el antígeno HBs en las muestras para las que los valores medidos son bajos o los resultados de falso negativo se obtienen mediante el método de análisis convencional de antígeno HBs, y se encontró que un método de análisis de antígeno HBs en el que se usan en combinación anticuerpos que reconocen péptidos en regiones específicas del antígeno HBs, para eliminar la aparición de falsos negativos y permitir la cuantificación exacta de antígeno HBs.
- 20 La presente invención se basa en tal descubrimiento.

### MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

- 25 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para analizar un antígeno HBs, caracterizado por usar como sondas de captura al menos una sonda de captura interna en la que dicha sonda de captura interna se une a un péptido, que consiste en aminoácidos, que se encuentran entre la posición 51 y la posición 60 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1; y al menos una sonda de captura externa, en la que dicha sonda de captura externa se une a un péptido, que consiste en aminoácidos, que se encuentran entre la
- 30 posición 111 y la posición 130 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1; y que usa como sondas de detección al menos una sonda de detección interna, en la que dicha sonda de detección interna se une a un péptido, que consiste en aminoácidos, que se encuentran entre la posición 51 y la posición 69 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1; y al menos una sonda de detección externa, en la que dicha sonda de detección externa se une a un péptido, que consiste en aminoácidos, que se encuentran entre la posición 98 y la
- 35 posición 156 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1.

- En otra realización preferida del método para analizar antígeno HBs según la presente invención, las sondas son anticuerpos monoclonales o fragmentos de las mismas y, en particular, el cuerpo monoclonal de captura interna se selecciona a partir del grupo que consiste en anticuerpo FERM BP-10117, anticuerpo FERM BP-10702, anticuerpo
- 40 FERM BP-10700 y anticuerpo FERM BP-10698; el anticuerpo monoclonal de detección interna se selecciona a partir del grupo que consiste en anticuerpo FERM BP-10117, anticuerpo FERM BP-10702, anticuerpo FERM BP-10700 y anticuerpo FERM BP-10698; el anticuerpo monoclonal de captura externa se selecciona a partir del grupo que consiste en anticuerpo FERM BP-10699, anticuerpo FERM BP-10703, anticuerpo FERM BP-10701 y anticuerpo
- 45 FERM BP-10697; el anticuerpo monoclonal de detección externa se selecciona a partir del grupo que consiste en anticuerpo FERM BP-10699, anticuerpo FERM BP-10703, anticuerpo FERM BP-10701 y anticuerpo FERM BP-10697; el anticuerpo monoclonal de captura interna y el anticuerpo monoclonal de detección interna son anticuerpos distintos; y el anticuerpo monoclonal de captura externa y el anticuerpo monoclonal de detección externa son anticuerpos distintos.

- 50 La presente invención también se refiere a un kit para analizar antígeno HBs, cuyo kit se caracteriza por comprender un portador de anticuerpos inmovilizados que comprende como sondas de captura al menos una sonda de captura interna y externa como se ha definido anteriormente, y como reactivo, al menos una sonda de detección interna y externa como se ha definido anteriormente.

- 55 La presente invención se refiere adicionalmente a un hibridoma de ratón depositado conforme a la referencia internacional n.º. FERM BP-10702, FERM BP-10698, FERM BP-10699, FERM BP-10703, FERM BP-10701, FERM BP-10700 o FERM BP-10697.

- 60 La presente invención se refiere adicionalmente a un hibridoma de ratón depositado conforme a la referencia internacional n.º. FERM BP-10702, FERM BP-10698, FERM BP-10699, FERM BP-10703, FERM BP-10701, FERM BP-10700 o FERM BP-10697, y a un anticuerpo monoclonal producido a partir del mismo.

- 65 Tal como se usa en el presente documento, un "análisis" incluye tanto la "detección" para determinar la presencia o ausencia de un compuesto a analizar y la "cuantificación" para determinar la abundancia de un compuesto a analizar.

El "método para analizar antígeno HBs" según la presente invención puede usarse como un "método de diagnóstico

para el VHB".

#### EFFECTO DE LA INVENCION

- 5 De acuerdo con la presente invención, es posible analizar antígeno HBs en las muestras para las cuales se han obtenido resultados de falso negativo mediante el método de análisis convencional de antígeno HBs. También es posible cuantificar con exactitud antígeno HBs en las muestras para las cuales los valores medidos son bajos en el método de análisis convencional de antígeno HBs.

#### 10 Breve descripción del dibujo

La Fig. 1 es una vista de un modelo de transmembrana del antígeno HBs.

#### MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCION

- 15 El antígeno HBs medido mediante el método de la presente invención para analizar antígeno HBs es una proteína de membrana que tiene una longitud total de 226 restos de aminoácidos, que penetra la membrana bicapa lipídica 4 veces. Varios genotipos tales como genotipos A, B, C, D, E, F y G se conocen en el VHB, y la secuencia de aminoácidos del antígeno HBs varía dependiendo del genotipo. Se conocen variaciones genéticas que varían entre distintas cepas de virus y tal cantidad de variaciones se conocen especialmente en la región externa de aminoácidos que se encuentran entre la posición 110 y la posición 156 de la membrana bicapa lipídica de una partícula de VHB. Los antígenos HBs que tienen tales secuencias de aminoácidos que muestran heterogeneidad pueden incluirse en los antígenos HBs a medir mediante el método de análisis de la presente invención para analizar antígeno HBs, y pueden medirse mediante el método de análisis de la presente invención.

- 25 La Fig. 1 muestra el modelo de estructura de transmembrana del antígeno HBs propuesto por Howard y col. El primer péptido de la región interna corresponde a la primera región interna de la bicapa lipídica que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 29 y la posición 80 en el modelo de estructura de transmembrana del antígeno HBs propuesto por Howard y col., pero el péptido no queda restringido a los aminoácidos que se encuentran en la posición 29 y la posición 80 del antígeno HBs y los número de los aminoácidos pueden variar debido a la mutación, delección y/o inserción de un aminoácido(s) de antígeno HBs. El segundo péptido de región externa corresponde a la segunda región externa (lumen del ER) que es hidrófila y que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran en la posición 89 y la posición 156 en el modelo de estructura de transmembrana del antígeno HBs, pero el péptido no queda restringido a los números de aminoácidos que se encuentran entre la posición 98 y la posición 156 del antígeno HBs y los número de aminoácidos pueden variar debido a la mutación, delección y/o inserción de un aminoácido(s) de antígeno HBs.

- El primer péptido de región interna es preferiblemente un péptido hidrófilo que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran en la posición 26 y la posición 80 del antígeno HBs, cuyo péptido existe en el lado interno de la membrana bicapa lipídica de una partícula del VHB. Habitualmente tiene la secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos que se encuentran en la posición 26 y la posición 80 en la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, el primer péptido de la región interna en el presente documento no queda restringido al péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos que se encuentran en la posición 26 y la posición 80 en la SEQ ID NO:1 del antígeno HBs siempre y cuando sea el primer péptido del extremo N del antígeno HBs entre aquellos que existen en el lado interno de la bicapa lipídica. Los ejemplos del mismo pueden incluir, por ejemplo, los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a distintos número de aminoácidos desde el extremo N y los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que son las mismas que las que corresponden a los aminoácidos que se encuentran en la posición 26 y la posición 80 en la SEQ ID NO:1 excepto que 1 o más aminoácidos sean sustituidos (mutados) en, delecionados desde, y/o insertados a 1 o más sitios en el mismo. El segundo péptido de la región externa es preferiblemente un péptido hidrófilo que existe en el lumen del ER en el lado externo de la membrana bicapa lipídica de una partícula de VHB, cuyo péptido consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 98 y la posición 156 del antígeno HBs. Habitualmente tiene la secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos que se encuentran en la posición 98 y la posición 156 en la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, el segundo péptido de la región externa en el presente documento no está restringido al péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos que se encuentran entre la posición 98 y la posición 156 en la SEQ ID NO:1 del antígeno HBs siempre y cuando sea el segundo péptido desde el extremo N del antígeno HBs entre aquellos que existen en el lado externo (lado del lumen= de la bicapa lipídica. Los ejemplos del mismo pueden incluir, por ejemplo, péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a distintos números de aminoácidos desde el extremo N y péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que son los mismos que los que se corresponden con los aminoácidos que se encuentran entre la posición 98 y la posición 156 en la SEQ ID NO:1 excepto que 1 o más aminoácidos sean sustituidos (mutados) en, delecionados desde, y/o insertados a 1 o más sitios en el mismo.

- 65 Las sondas de captura interna y las sondas de detección interna pueden usarse en la presente invención como se define en la reivindicación 1. También se describen sondas que se unen al péptido, que consiste en aminoácidos, que se encuentran entre la posición 26 y la posición 80 en la SEQ ID NO:1 y sondas que se unen a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma que la que se corresponden con los aminoácidos que se

encuentran entre la posición 26 y la posición 80 en la SEQ ID NO:1 excepto que 1 o más aminoácidos sean sustituidos (mutados) en, delecionados desde, y/o insertados a 1 o más sitios en el mismo. Más particularmente, se describen sondas, cuyas sondas se unen al péptido, que consiste en aminoácidos, que se encuentran entre la posición 31 y la posición 50, consistiendo el péptido en aminoácidos que se encuentran entre la posición 51 y la posición 70, consistiendo el péptido en aminoácidos que se encuentran entre la posición 21 y la posición 40, consistiendo el péptido en aminoácidos que se encuentran entre la posición 71 y la posición 90 y consistiendo el péptido en aminoácidos que se encuentran entre la posición 61 y la posición 80 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:1; o a péptidos que tienen las mismas secuencias de aminoácidos que estas excepto que sus aminoácidos se sustituyen parcialmente.

Las sondas de captura externa y las sondas de detección externa que pueden usarse en la presente invención son como se describe en la reivindicación 1. También se describen sondas que se unen al péptido, que consiste en aminoácidos, que se encuentran entre la posición 121 y la posición 130, consistiendo el péptido en aminoácidos que se encuentran entre la posición 151 y la posición 170, consistiendo el péptido en aminoácidos que se encuentran en la posición 121 y la posición 140, en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:1; o a péptidos que tienen las mismas secuencias de aminoácidos que estas excepto que sus aminoácidos se sustituyen parcialmente, respectivamente. Entre los ejemplos de epítopos a los que las sondas de captura externa se unen se incluye adicionalmente un epítipo estructural que tiene una gran estructura dimensional compleja, tal como el determinante antigénico común a. Por lo tanto, también hay epítopos que pueden no estar formados por un péptido parcial que consiste solo de aminoácidos que se encuentran entre la posición 98 y la posición 156 en la SEQ ID NO:1 sino que pueden formarse por un péptido más largo que esta porción, por ejemplo, la longitud total del péptido que consiste de restos de aminoácidos de la posición 226 que corresponde a la longitud total del antígeno HBs.

Las sondas que pueden usarse en la presente invención no están restringidas siempre y cuando sean moléculas capaces de unirse a un primer péptido de región interna, un segundo péptido de región externa o un epítipo de región estructural en la segunda región externa. Los ejemplos de los mismos incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, receptores y análogos. Se prefieren anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos.

Los fragmentos de anticuerpo de los anticuerpos monoclonales no quedan restringidos siempre y cuando estos comprenden una región de unión de antígeno que se une a un primer péptido de región interna, un péptido de región externa y a un epítipo de región estructural en la segunda región externa, y ejemplos de los mismos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv. Estos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse mediante, por ejemplo, la digestión del cuerpo monoclonal de la presente invención mediante un método convencional usando una enzima proteolítica (tal como pepsina o papaína), y posteriormente la purificación del producto digerido mediante un método convencional de separación y purificación de proteínas.

En el presente documento a continuación se ilustran realizaciones que usan anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales como las sondas, pero el método de la presente invención para analizar antígeno HBs puede llevarse a cabo de forma similar o también usando otras sondas.

El principio de medición del método para analizar antígeno HBs no queda restringido siempre y cuando sea un método para detectar antígeno HBs usando un(os) anticuerpo(s) de captura y anticuerpo(s) de detección y es preferiblemente un ensayo sándwich. Entre los ejemplos de ensayo sándwich se incluye el sucesivo ensayo sándwich y el ensayo sándwich inverso que son métodos de 2 etapas, así como el método de 1 etapa.

El método para analizar antígeno HBs puede comprender (i) la etapa de contacto en la que: al menos un anticuerpo de captura interna que se une al primer péptido de región interna de antígeno HBs y al menos un anticuerpo de captura externa que se une a un segundo péptido de región externa de antígeno HBs; una muestra de prueba; y al menos un anticuerpo de detección interna que se une al primer péptido de región interna y al menos un anticuerpo de detección externa que se une al segundo péptido de región externa; se ponen en contacto; y (ii) la etapa de detección, en donde se detectan señales de detección de anticuerpos.

La anterior etapa de contacto puede llevarse a cabo en dos etapas separadas, es decir, la primera etapa de contacto en la que al menos un anticuerpo de captura interna que se une al primer péptido de región interna de antígeno HBs y al menos un anticuerpo de captura externa que se une al segundo péptido de región externa de antígeno HBs se ponen en contacto con el menos una muestra de prueba; y la segunda etapa de contacto en la que el complejo de antígeno-anticuerpo formado en la primera etapa de contacto se pone en contacto con el menos un anticuerpo de detección interna que se une al primer péptido de región interna y al menos un anticuerpo de detección externa que se une al segundo péptido de región externa.

Más particularmente, el ensayo sándwich de más adelante se puede llevar a cabo como sigue. En primer lugar, anticuerpos de captura que se unen al antígeno HBs se inmovilizan sobre un portador(es) insoluble(s) tales como microplacas o microesferas. Se lleva a cabo a continuación un bloqueo usando un agente de bloqueo adecuado (tal como albúmina o gelatina de suero bovino) para evitar la adsorción no específica a anticuerpos de captura y portador(es) insoluble(s). Se añade a la placa o microesferas sobre las cuales se han inmovilizado los anticuerpos de captura, una muestra de prueba que contiene antígeno HBs junto con la solución de reacción primaria, y los

anticuerpos de captura se ponen en contacto con y se unen al antígeno HBs (la etapa de reacción primaria). A continuación, el antígeno no unido a los anticuerpos de captura e impurezas, se elimina por lavado mediante una solución de lavado apropiada (por ejemplo, un tampón de fosfato que contiene un tensioactivo). Posteriormente, se añaden al mismo anticuerpos marcados que reconocen el antígeno HBs capturado y a los cuales hay unida una  
 5 enzima tal como peroxidasa de rábano picante (HRP), para permitir que los anticuerpos marcados se unan al antígeno capturado (la etapa de reacción secundaria). Mediante esta reacción, un complejo inmune de los anticuerpos de captura -antígeno - anticuerpos marcados se forma sobre el portador(es) tales como la microplaca. Después de eliminar por lavado los anticuerpos marcados no unidos con la solución de lavado, se añade un sustrato colorante o un sustrato luminiscente para la enzima de los anticuerpos marcados y se permite que la enzima  
 10 reaccione con el sustrato, para permitir la detección de una señal.

Los anticuerpos de captura usados en el método de la presente invención para analizar antígeno HBs son anticuerpos que capturan antígeno HBs en una muestra de prueba y, en el ensayo sándwich usando el/los portador(es) insoluble(s) anterior(es), estos son anticuerpos inmovilizados que están inmovilizados sobre el/los  
 15 portador(es) insoluble(s). Al menos un anticuerpo de captura interna que se une a un primer péptido de región interna de antígeno HBs y al menos un anticuerpo de captura externa que se une a un segundo péptido de región externa de antígeno HBs se usan en combinación como anticuerpos de captura. Además de estos 2 anticuerpos, pueden añadirse adicionalmente otros anticuerpos y usarse como anticuerpos de captura.

Los anticuerpos de detección usados en el método de la presente invención para analizar antígeno HBs son anticuerpos que detectan antígeno HBs capturado mediante los anticuerpos de captura en una muestra de prueba y en el ensayo de sándwich usando el/los portador(es) insoluble(s) anterior(es), estos son anticuerpos marcados que  
 20 están marcados mediante una enzima o similar. Al menos un anticuerpo de detección interna que se une al primer péptido de región interna de antígeno HBs y al menos un anticuerpo de detección externa se une al segundo péptido de región externa de antígeno HBs se usan en combinación como anticuerpos de detección. Además de estos 2 anticuerpos, pueden añadirse adicionalmente otros anticuerpos y usarse como anticuerpos de detección.

El anticuerpo de captura interna y el anticuerpo de detección interna que se une al primer péptido de región interna del antígeno HBs se une preferiblemente a distintos epítomos. "Distintos epítomos" significa que los epítomos no son  
 30 completamente los mismos. Por ejemplo, los epítomos de los dos anticuerpos son completamente los mismos en casos, en donde estos dos anticuerpos son los mismos anticuerpos monoclonales o donde los dos anticuerpos están completamente inhibidos en la prueba de inhibición de epítomos. Incluso es casos, en donde el epítomo del anticuerpo de captura interna y el epítomo del anticuerpo de detección interna se solapan parcialmente, pueden usarse en el método de la presente invención para analizar antígeno HBs en muchos casos.

El anticuerpo de captura externa y el anticuerpo de detección externa que se unen al segundo péptido de región externa que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 98 y la posición 156 del antígeno  
 40 HBs también se unen a distintos epítomos. "Distintos epítomos" significa que los epítomos no son completamente los mismos. Por ejemplo, los epítomos de los dos anticuerpos son completamente los mismos en casos, en donde estos dos anticuerpos son los mismos anticuerpos monoclonales o donde los dos anticuerpos están completamente inhibidos en la prueba de inhibición de epítomos. Incluso es casos, en donde el epítomo del anticuerpo de captura externa y el epítomo del anticuerpo de detección externa se solapan parcialmente, pueden usarse en el método de la presente invención para analizar antígeno HBs en muchos casos.

Ejemplos de los epítomos que se son reconocidos mediante las sondas, en particular anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo de los mismos, de la presente invención incluyen epítomos continuos compuestos de  
 45 restos de aminoácidos continuos y epítomos estructurales (epítomos discontinuos) que han sido formados por un(as) estructura(s) de lámina del antígeno HBs y compuestos de una combinación de aminoácidos discontinuos.

Ejemplos de la enzima que marca los anticuerpos incluye peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa y similares. A parte de enzimas, pueden usarse como sustancias marcadoras sustancias  
 50 luminiscentes tales como derivados de acridinio, sustancias fluorescentes tales como europio, sustancias radioactivas tales como  $I^{125}$  y similares. El sustrato y la sustancia desencadenante de la luminiscencia pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo de la sustancia marcadora.

Entre los ejemplos de anticuerpos marcados en la presente invención también se incluye anticuerpos que tienen, como marcadores de detección, sustancias unidas a los mismos tales como haptenos, péptidos de bajo peso  
 60 molecular y lectinas que pueden usarse para la detección de una señal de la reacción antígeno-anticuerpo. Entre los ejemplos de haptenos se incluye biotina, dinitrofenol (DNP) y FITC. Por ejemplo, en casos donde la biotina está unida al anticuerpo para proporcionar un complejo de sonda, la avidina, que tiene una afinidad a la biotina, puede marcarse con una enzima tal como HRP, una sustancia fluorescente tal como fluoresceína o una sustancia luminiscente tal como un derivado de acridinio; y la avidina marcada pueden permitirse que reaccionen con el complejo de sonda, para permitir la detección de una señal mediante coloración, fluorescencia, luminiscencia o similar.

El método para marcar el anticuerpo no queda restringido y puede usarse un método convencional, y ejemplos del mismo incluyen métodos, en donde el anticuerpo está marcado directamente con un marcador tal como una enzima,

métodos, en donde el anticuerpo y un marcador tal como una enzima están unidos a un compuesto macromolecular tal como dextrano, y métodos, en donde un anticuerpo marcado está unido a un compuesto macromolecular tal como dextrano.

5 Entre los ejemplos de anticuerpos de la presente invención se incluye anticuerpos policlonales a partir de animales y anticuerpos monoclonales a partir de humanos y ratón, y pueden usarse métodos conocidos para inmunizar los animales para obtener los anticuerpos y para obtener hibridomas que produzcan los anticuerpos monoclonales excepto ese antígeno HBs o un péptido parcial de antígeno HBs se usa como un inmunógeno, cuyos métodos pueden llevarse a cabo según, por ejemplo, aquellos descritos en "Biochemistry Experiments Lecture, Continued Edition" (Japanese Biochemical Society ed.), o "Immunobiochemistry Research Techniques" (Japanese Biochemical Society ed). El antígeno HBs usado para la inmunización pueden ser partículas víricas o antígeno HBs purificado a partir de partículas víricas. El antígeno HBs, primer péptido de la región interna y el segundo péptido de la región externa pueden obtenerse mediante, por ejemplo, la expresión de estos antígenos en *E. coli* mediante recombinación genética y purificación del mismo. También puede prepararse un péptido parcial de antígeno HBs mediante síntesis química mediante, por ejemplo, síntesis de fase sólida de Fmoc o síntesis de fase sólida de Boc. Este péptido sintetizado puede purificarse mediante un método convencional tal como HPLC y su aminoácido terminal puede estar fabricado para que sea cisteína cuyo grupo SH puede usarse para unir el péptido a una proteína portadora, cuyo péptido de unión puede usarse a continuación como inmunógeno.

10 Los anticuerpos de la presente invención pueden obtenerse mediante inmunización de animales usando el antígeno HBs, el primer péptido de región interna y el segundo péptido de región externa como inmunógenos. El animal a inmunizar no está restringido y los ejemplos del mismo incluyen oveja, cabra, conejo, ratón, rata, cobaya, pájaro, bovinos y equinos. El antígeno HBs, el primer péptido de región interna y el segundo péptido de región externa se mezclan y emulsionan con una cantidad igual de adyuvante completo de Freund o Titer-Max gold (Titer Max) y la mezcla resultante se administra a un conejo subcutáneamente o a un ratón intraperitonealmente. A continuación, la misma inmunomanipulación se repite a intervalos de 1 a 2 semanas. Los anticuerpos de la presente invención pueden obtenerse mediante la recolección de sangre a partir del animal inmunizado como anteriormente y mediante la obtención de suero o plasma a partir de este.

15 El hibridoma de la presente invención que produce el anticuerpo monoclonal de la presente invención puede obtenerse a partir del animal que ha sido sometido a la anterior inmunomanipulación. Por ejemplo, después de someter 2 semanas a un ratón varias veces a inmunomanipulación, el antígeno HBs, el primer péptido de región interna y el segundo péptido de región externa disueltos en solución salina fosfatada (PBS) se inoculan a través de la vena caudal. Dos o tres días después, el bazo que contiene linfocitos que producen anticuerpos se retira asépticamente del ratón. Estos linfocitos pueden, por ejemplo, fusionarse con células de mieloma para establecer un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal.

20 La fusión celular puede llevarse a cabo, por ejemplo, fusionando linfocitos y células de mieloma en presencia de polietilenglicol. Por ejemplo, células conocidas que tienen marcadores tales como deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa o deficiencia de timidinquinasa pueden usarse como las células de mieloma. En particular, entre los ejemplos de células se incluye p3NS-1/1 · Ag4.1 y SP2/0-Ag14. Las células fusionadas se seleccionan destruyendo las células no fusionadas usando un medio de selección tal como medio HAT.

25 Posteriormente, se identifica la presencia o ausencia de producción de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo de los hibridomas que han crecido. La detección puede llevarse a cabo midiendo la producción de anticuerpos específicos respecto al antígeno HBs, el primer péptido de región interna y el segundo péptido de región externa mediante el uso de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o similar. La clonalidad de los anticuerpos monoclonales puede asegurarse mediante la selección de clones de los hibridomas que secretan anticuerpos de interés y repitiendo adicionalmente el subclonaje limitando el método de dilución. De este modo, los hibridomas que producen los anticuerpos de la presente invención pueden seleccionarse, y las líneas celulares del hibridoma HBs121 [nº. de referencia internacional FERM BP-10697], HBs123 [nº de referencia internacional FERM BP-10698], HBs136 [nº de referencia internacional FERM BP-10699], HBs163 [nº de referencia internacional FERM BP-10700], HBs605C3 [nº de referencia internacional FERM BP-10701], SF111 [nº de referencia internacional FERM BP-10702], SF124CS [nº de referencia internacional FERM BP-10703], que producen los anticuerpos monoclonales de la presente invención, se depositaron en el Organismo Depositario Internacional de Patentes, el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japón) el 12 de octubre de 2006. La línea celular de hibridoma 6G6 [nº. de referencia internacional FERM BP-10117] se ha depositado Organismo Depositario Internacional de Patentes, el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada el 9 de septiembre de 2004.

30 En la presente memoria descriptiva, un anticuerpo producido por una línea celular de hibridoma se designa por el nombre de la línea celular del hibridoma seguido del término "anticuerpo" o por el nombre en el que el número de referencia internacional de la línea celular está seguido del término "anticuerpo". Por ejemplo, el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma HBs121 se hace referencia como "HBs121 anticuerpo" o "FERM BP-10697 anticuerpo".

Los hibridomas de la presente invención pueden subcultivarse en un medio conocido arbitrario tal como RPMI1640.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede prepararse mediante el cultivo de este hibridoma. Por ejemplo, añadiendo un 10 % de suero de feto bovino al medio RPMI1640 y cultivando el hibridoma a 37 °C en presencia de un 5 % de CO<sub>2</sub>, el anticuerpo se produce en el sobrenadante de cultivo. Además, el anticuerpo puede obtenerse mediante la inoculación del hibridoma intraperitonealmente a un ratón tratado previamente con pristano y recuperando su ascitis 10-20 días después, en cuya ascitis se produjo el anticuerpo. El anticuerpo de la presente invención puede purificarse mediante cualquier método conocido, por ejemplo, un método de purificación usando columna de proteína G o columna de proteína A, un método usando una columna de afinidad a la cual se une el antígeno HBs, o un método usando una columna de intercambio de iones.

El epítipo que se reconoce mediante el anticuerpo monoclonal obtenido puede determinarse a partir de la secuencia del antígeno HBs, mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando un antígeno recombinante preparado, un primer péptido de región interna, un segundo péptido de región externa o un péptido sintético sintetizado químicamente con la longitud de 10 a 20 aminoácidos. El epítipo del anticuerpo monoclonal producido por cada hibridoma de la presente invención se determinó de acuerdo a las reactividades con péptidos químicamente sintetizados que tenían 20 restos de aminoácidos que se solapaban entre sí mediante 10 restos de aminoácidos basándose en las secuencias de aminoácidos de antígenos HBs que tenían distintos genotipos. El anticuerpo HBs121 se une a los péptidos que consisten en los restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 151 y la posición 170 de los genotipos C y D, pero no se une a los péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 151 y la posición 170 de los genotipos A y B. El anticuerpo HBs123 se une a los péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 50 de los genotipos A a D. El anticuerpo HBs136 se une a los péptidos que consisten en restos de aminoácidos que encuentran entre la posición 111 y la posición 130 de los genotipos A, C y D. El anticuerpo HBs163 se une a los péptidos que consisten en restos de aminoácidos que encuentran entre la posición 31 y la posición 50 de los genotipos A a D. El anticuerpo SF111 se une a los péptidos que consisten en restos de aminoácidos que encuentran entre la posición 51 y la posición 69 de los genotipos A, B y C. Por otro lado, el anticuerpo HBs605C3 y el anticuerpo SF124CS no se unen a ninguno de los péptidos que consisten en 20 restos de aminoácidos. Puesto que el anticuerpo HBs605C3 y el anticuerpo SF124CS se unen al antígeno HBs que consiste en estos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 1 y la posición 226, y se unen al péptido que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 98 y la posición 156, son anticuerpos que reconocen un epítipo estructural de antígeno HBs, por ejemplo, el determinante antigénico común a. Además, el anticuerpo 6G6 que se usa en los ejemplos a continuación es un anticuerpo que se une al péptido que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 51 y la posición 60 y, en particular, se une al péptido que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 41 y la posición 60 y el péptido que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 51 y la posición 70 de antígeno HBs.

El kit de la presente invención para analizar antígeno HBs mediante ensayo de sándwich puede comprender: un portador insoluble (por ejemplo, una placa de 96 pocillos o microesferas) sobre las cuales al menos una sonda de captura interna que se une a un primer péptido de región interna de antígeno HBs y al menos una sonda de captura externa que se une a un segundo péptido de región externa de antígeno HBs se inmoviliza; y un reactivo que comprende como sondas de detección al menos una sonda de detección interna que se une al primer péptido de región interna y al menos una sonda de detección externa que se une al segundo péptido de región externa. El reactivo para analizar antígeno HBs puede proporcionarse en la forma de una solución y también puede proporcionarse en la forma de un polvo liofilizado. El kit de la presente invención para analizar antígeno HBs puede comprender antígeno vírico de la hepatitis B, otro anticuerpo vírico de antihepatitis B, unas instrucciones del fabricante y similares.

### Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación de manera más concreta por medio de Ejemplos y Ejemplos comparativos, aunque el alcance de la presente invención no se limita a estos.

#### Ejemplo 1

Establecimiento de hibridoma productor de anticuerpos monoclonales

(A) Antígeno HBs

Un fragmento de ADN que codifica el péptido, que consiste en aminoácidos, que se encuentran entre la posición 26 y la posición 80 de antígeno HBs se incorporó dentro de un vector pATrpE, que es un vector de expresión. El pATrpE-HBs(26-80) obtenido se expresó en la cepa HB101 de *E. coli*, y se recogieron las células. El antígeno expresado se purificó mediante filtración de gel y columnas de intercambio de iones para obtener antígeno TrpE-HBs(26-80). Este antígeno TrpE-HBs(26-80), rHBsAg adquirido (Levadura; Advanced Chemical) y rHBsAg (CHO; Anapure) se usaron para la inmunización, medición del título del anticuerpo del ratón mediante ELISA y detección mediante ELISA.



## (B) Inmunización

Se mezcló y emulsionó una solución de antígeno (2 mg/ml) de antígeno TrpE-HBs(26-80), rHBsAg (Levadura) o rHBsAg (CHO) con una cantidad igual de Titer-Max Gold (Titer Max EE.UU.), y 0,1 ml de la mezcla resultante se inyectó en la cavidad abdominales o a las almohadillas plantares de ratones hembra Balb/c de 4 a 6 semanas de edad, para inmunizar los ratones (la primera inmunización). En intervalos de 1 semana, 0,1 ml de una mezcla preparada del mismo modo se administró dos veces intraperitonealmente (la segunda y tercera inmunización). En algunos casos, se llevó a cabo adicionalmente la cuarta y quinta inmunización. Una semana después, se recogió sangre de cada ratón, y el título del anticuerpo se midió según el método (C) que se describe a continuación.

Respecto al ratón con títulos de anticuerpo aumentados, se diluyó una solución de antígeno (0,1 mg/ml) de antígeno TrpE-HBs(26-80), rHBsAg (Levadura) o rHBsAg (CHO) con una cantidad igual de PBS y 0,1 ml de la dilución se administró a los ratones intravenosamente (la inmunización final). Después de tres días desde la inmunización final, se retiró asépticamente el bazo o el ganglio linfático inguinal y se usó para la etapa de fusión celular (D) a continuación.

## (C) Medición del título de anticuerpo mediante ELISA

Se colocó a una placa de 96 pocillos para ELISA (Nunc), 100  $\mu$ l de cada antígeno TrpE-HBs(26-80), antígeno rHBsAg (Levadura) o antígeno HBsAg (CHO) (1  $\mu$ g/ml) y se dejó reposar a 4 °C durante la noche. Cada pocillo de esta placa se bloqueó a continuación con solución salina fosfatada (PBS) que contenía un 0,5 % de caseinato de sodio y un 2 % de sacarosa durante 30 minutos. Después de retirar la solución de bloqueo, el suero obtenido en la etapa anterior (B) se diluyó de 1.000 a 1.000.000 de veces con PBS que contenía un 0,1 % de caseinato de sodio, un 1 % de albúmina de suero bovino (BSA), 1mM de EDTA y un 0,01 % de Tween 20, y 100  $\mu$ l de la dilución resultante se añadió al pocillo. La placa se dejó reposar a una temperatura ambiente durante 60 minutos y se lavó 3 veces con un 0,05 % de Tween 20/PBS (en lo sucesivo en el presente documento se hará referencia como PBST). Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ l de anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (cabra, Jackson) (0.08  $\mu$ g/ml) a la placa y se dejó reposar a una temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de lavado de la placa 4 veces con PBST de nuevo. A cada pocillo, se añadieron 100  $\mu$ l de solución de sustrato de OPD [0,075M tampón de fosfato-citrato (pH 5,0) que contiene 2,2 mM de o-fenilenediamina y 0,03 % de solución de peróxido de hidrógeno acuosa] y se dejó proceder la reacción a 25 °C durante 30 minutos, seguido por la adición de 100  $\mu$ l de 1 M de ácido sulfúrico. Se midió la absorbencia a 492 nm de la muestra en cada pocillo.

## (D) Fusión celular

El bazo o el ganglio linfático inguinal que se ha retirado asépticamente se colocó en una placa de Petri que contenía 8 ml de medio RPMI1640. Después de desasociar las células el bazo, estas células del bazo o el ganglio linfático inguinal se pasaron a través de una malla y se recogieron en un tubo centrífugo de 50 ml. Después de añadir 32 ml de medio RPMI1640 al mismo, la mezcla resultante se suspendió y centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. Después de aspirar el sobrenadante, el sedimento se suspendió en 40 ml de medio RPMI y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. Esta operación se llevó a cabo dos veces. El sedimento celular por lo tanto obtenido se resuspendió en 40 ml de medio RPMI1640 y se contaron las células del bazo o células del ganglio linfático inguinal.

Por otra parte, las células del bazo o del ganglio linfático inguinal (aproximadamente  $1 \times 10^8$  células) se añadieron a células de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 [banco de genes] (aproximadamente  $2 \times 10^7$  células) se precultivaron en un tubo de 50 ml y la mezcla resultante se mezcló bien en el medio RPMI1640, seguido de centrifugación (150 x g, 5 minutos). Después de aspirar el sobrenadante, el sedimento se desprendió bien y se añadió gota a gota al mismo 1 ml de un 50 % de polietilenglicol (PEG) 4000 precalentado a 37 °C, seguido por la rotación suavemente del tubo centrífugo a mano durante 1 minuto para mezclar la solución de PEG y el sedimento celular. Posteriormente, se añadieron 9 ml de medio RPMI1640 precalentado a 37 °C al tubo, que a continuación se hizo rotar suavemente. A continuación se llevó a cabo la centrifugación (150 x g, 5 minutos) y se retiró el sobrenadante, seguido de la suspensión del sedimento celular en 50 ml de medio HAT (medio RPMI1640 que contiene aminoptericina ( $4 \times 10^{-7}$  M, concentración final), timidina ( $1.6 \times 10^{-5}$  M, concentración final), e hipoxantina ( $1 \times 10^{-4}$  M, concentración final)) que contiene un 10 % de suero bovino fetal y un 5 % de BriClone (human IL-6, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.). Se tomaron alícuotas de esta suspensión celular en 100  $\mu$ l de volúmenes a pocillos de una placa de cultivo celular de 96 pocillos, y se inició el cultivo en una incubadora de CO<sub>2</sub> que contenía un 5 % de gas de dióxido de carbono a 37 °C. Durante el cultivo, en intervalos de 2 a 3 días, se retiró aproximadamente 100  $\mu$ l del medio de cada pocillo y se añadieron 100  $\mu$ l frescos al mismo del anterior medio HAT, para seleccionar hibridomas que proliferen en el medio HAT. Sobre aproximadamente el día 10, se llevó a cabo la detección de los siguientes hibridomas.

## (E) Detección de hibridomas

La detección de hibridomas se llevó a cabo mediante la medición repetida del título del anticuerpo mediante ELISA del mismo modo que en la etapa anterior (C) excepto que se usaron 100  $\mu$ l del sobrenadante de cultivo de cada hibridoma en lugar de la muestra de sangre. Cada uno de los hibridomas en los pocillos para los cuales se observó la producción de anticuerpos se clonó mediante el método de dilución limitante. ELISA se llevó a cabo de forma similar 10 días después para detectar clones de hibridomas que producían los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Como resultado, se establecieron las líneas celulares de hibridoma HBs121 [nº de referencia

internacional FERM BP-10697], HBs123 [nº de referencia internacional FERM BP-10698], HBs136 [nº de referencia internacional FERM BP-10699], HBs163 [nº de referencia internacional FERM BP-10700], HBs605C3 [nº de referencia internacional FERM BP-10701], SF111 [nº de referencia internacional FERM BP-10702] y SF124CS [nº de referencia internacional FERM BP-10703]. Cada hibridoma se depositó en el Organismo Depositario Internacional de Patentes, el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japón) el 12 de octubre de 2006.

El epítipo del anticuerpo monoclonal producido por cada hibridoma de la presente invención se determinó mediante ELISA usando péptidos que tenían 20 restos de aminoácidos derivados a partir del antígeno HBs. Los péptidos que tenían 20 restos de aminoácidos o 19 restos de aminoácidos que se solapaban entre sí por 10 restos de aminoácidos basándose en las secuencias de aminoácidos de antígeno HBs que tenían distintos genotipos que sintetizaron químicamente y se usaron como antígenos para ELISA. Los péptidos usados para la determinación de epítipos se muestran en la Tabla 1. Se usaron PepHBS1AD (SEQ ID NO:2), PepHBS1B (SEQ ID NO:3), PepHBS1C2 (SEQ ID NO:4) y PepHBS1C (SEQ ID NO:5) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 1 y la posición 20; PepHBS2ACD (SEQ ID NO:6) y PepHBS2B (SEQ ID NO:7) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 11 y la posición 30; PepHBS3ACD (SEQ ID NO:8) como un péptido que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 21 y la posición 40; PepHBS4A (SEQ ID NO:9), PepHBS4B (SEQ ID NO: 10), PepHBS4C (SEQ ID NO:11) y PepHBS4D (SEQ ID NO:12) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 31 y la posición 50; PepHBS5A (SEQ ID NO: 13), PepHBS5B (SEQ ID NO:14), PepHBS5C (SEQ ID NO:15) y PepHBS5D (SEQ ID NO: 16) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 41 y la posición 60; PepHBS6AC (SEQ ID NO: 17) and PepHBS6B (SEQ ID NO:18) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 51 y la posición 69; PepHBS7AC (SEQ ID NO:19) y PepHBS7D (SEQ ID NO:20) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 61 y la posición 80; PepHBS8ACD (SEQ ID NO:21) y PepHBS8B (SEQ ID NO:22) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 71 y la posición 90; PepHBS9ACD (SEQ ID NO:23) como un péptido que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 81 y la posición 100; PepHBS10C (SEQ ID NO:24) como un péptido que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 91 y la posición 110; PepHBS11A (SEQ ID NO:25), PepHBS11BD (SEQ ID NO:26) y PepHBS11C (SEQ ID NO:27) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 101 y la posición 119; PepHBS12A (SEQ ID NO:28), PepHBS12C (SEQ ID NO:29), PepHBS12D1 (SEQ ID NO:30) y PepHBS12D2 (SEQ ID NO:31) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 111 y la posición 130; PepHBS13A (SEQ ID NO:32), PepHBS13B (SEQ ID NO:33), PepHBS13C (SEQ ID NO:34), PepHBS13D1 (SEQ ID NO:35) y PepHBS13D2 (SEQ ID NO:36) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 121 y la posición 140; PepHBS14A (SEQ ID NO:37) y PepHBS14C (SEQ ID NO:38) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 131 y la posición 150; PepHBS15C (SEQ ID NO:39) como un péptido que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 141 y la posición 160; PepHBS16AB (SEQ ID NO:40), PepHBS16C2 (SEQ ID NO:41), PepHBS16C (SEQ ID NO:42) y PepHBS16D (SEQ ID NO:43) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 151 y la posición 170; PepHBS 17C (SEQ ID NO:44) y PepHBS17D (SEQ ID NO:45) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 161 y la posición 180; PepHBS18ABD (SEQ ID NO:46) y PepHBS18C (SEQ ID NO:47) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 171 y la posición 190; PepHBS19A (SEQ ID NO:48) y PepHBS19C (SEQ ID NO:49) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 181 y la posición 200; PepHBS20A (SEQ ID NO:50), PepHBS20B (SEQ ID NO:51) y PepHBS20C (SEQ ID NO:52) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 191 y la posición 210; PepHBS21A (SEQ ID NO:53), PepHBS21B (SEQ ID NO:54), PepHBS21C (SEQ ID NO:55) y PepHBS21D (SEQ ID NO:56) como péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 201 y la posición 220; y PepHBS22CD (SEQ ID NO:57) como un péptido que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 211 y la posición 226 de antígeno HBs. El carácter A, B, C, D o similar en el extremo del nombre de cada péptido indica que la secuencia de aminoácidos del péptido es una secuencia de aminoácidos de un genotipo representativo. Además, "AB" indica que la secuencia de aminoácidos del péptido es la secuencia de aminoácidos común entre los genotipos A y B.

Según los resultados del análisis de epítipo, el anticuerpo HBs121 unido a PepHBS16C2, PepHBS16C y PepHBS16D que son péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 151 y la posición 170, pero no se unen a PepHBS 16AB. El anticuerpo HBs123 unido a PepHBS4A, PepHBS16C y PepHBS16D que son péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 31 y la posición 50, pero no se unen a PepHBS4D. El anticuerpo HBs136 unido a PepHBS 12A, PepHBS 12C, PepHBS12D1 y PepHBS 12D2 que son péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 11 y la posición 130. El anticuerpo HBs163 unido a PepHBS4A, PepHBS16C y PepHBS16D que son péptidos que consisten en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 31 y la posición 50, pero no se unen a PepHBS4D. El anticuerpo SF111 unido a PepHBS6AC que es un péptido que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 51 y la posición 69, pero no se unen a PepHBS6B. Por otra parte, el anticuerpo HBs605C3 y el anticuerpo SF124CS unido al antígeno HBs que consiste en restos de aminoácidos que se encuentran entre la posición 1 y la posición 226, pero no se unen a péptidos que tienen 20 restos de aminoácidos.

[Tabla 1]

No.	1	5	10	15	20															
PepHBS1AD	M	E	N	I	T	S	G	F	L	G	P	L	L	V	L	Q	A	G	F	F
PepHBS1B	M	E	N	I	A	S	G	L	L	G	P	L	L	V	L	Q	A	G	F	F
PepHBS1C2	M	E	N	T	T	S	G	F	L	G	P	L	L	V	L	Q	A	G	F	F
PepHBS1C	M	E	S	T	T	S	G	F	L	G	P	L	L	V	L	Q	A	G	F	F
PepHBS2ACD	P	L	L	V	L	Q	A	G	F	F	L	L	T	R	I	L	T	I	P	Q
PepHBS2B	P	L	L	V	L	Q	A	G	F	F	L	L	T	K	I	L	T	I	P	Q
PepHBS3ACD	L	L	T	R	I	L	T	I	P	Q	S	L	D	S	W	W	T	S	L	N
PepHBS4A	S	L	D	S	W	W	T	S	L	N	F	L	G	G	S	P	V	C	L	G
PepHBS4B	S	L	D	S	W	W	T	S	L	N	F	L	G	G	T	P	V	C	L	G
PepHBS4C	S	L	D	S	W	W	T	S	L	N	F	L	G	G	A	P	T	C	P	G
PepHBS4D	S	L	D	S	W	W	T	S	L	N	F	L	G	G	T	T	V	C	L	G
PepHBS5A	F	L	G	G	S	P	V	C	L	G	Q	N	S	Q	S	P	T	S	N	H
PepHBS5B	F	L	G	G	T	P	V	C	L	G	Q	N	S	Q	S	Q	I	S	S	H
PepHBS5C	F	L	G	G	A	P	T	C	P	G	Q	N	S	Q	S	P	T	S	N	H
PepHBS5D	F	L	G	G	T	T	V	C	L	G	Q	N	S	Q	S	P	T	S	N	H
PepHBS6AC	Q	N	S	Q	S	P	T	S	N	H	S	P	T	S	C	P	P	I	C	
PepHBS6B	Q	N	S	Q	S	Q	I	S	S	H	S	P	T	C	C	P	P	I	C	
PepHBS7AC	S	P	T	S	C	P	P	I	C	P	G	Y	R	W	M	C	L	R	R	F
PepHBS7D	S	P	T	S	C	P	P	T	C	P	G	Y	R	W	M	C	L	R	R	F
PepHBS8ACD	G	Y	R	W	M	C	L	R	R	F	I	I	F	L	F	I	L	L	L	C
PepHBS8B	G	Y	R	W	M	C	L	R	R	F	I	I	F	L	C	I	L	L	L	C
PepHBS9ACD	I	I	F	L	F	I	L	L	L	C	L	I	F	L	I	V	L	L	D	Y
PepHBS10C	L	I	F	L	L	V	L	L	D	Y	Q	G	M	L	P	V	C	P	L	L
PepHBS11A	Q	G	M	L	P	V	C	P	L	I	P	G	S	T	T	T	S	T	G	
PepHBS11B	Q	G	M	L	P	V	C	P	L	I	P	G	S	T	T	T	S	T	G	
PepHBS11C	Q	G	M	L	P	V	C	P	L	L	P	G	T	S	T	T	S	T	G	
PepHBS12A	P	G	S	T	T	T	S	T	G	P	C	K	T	C	T	T	P	A	Q	G
PepHBS12C	P	G	T	S	T	T	S	T	G	P	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G
PepHBS12D1	P	G	S	S	T	T	S	T	G	P	C	R	T	C	T	T	P	A	Q	G
PepHBS12D2	P	G	S	S	T	T	S	T	G	P	C	R	T	C	M	T	T	A	Q	G
PepHBS13A	C	K	T	C	T	T	P	A	Q	G	N	S	M	F	P	S	C	C	C	T
PepHBS13B	C	K	T	C	T	T	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T
PepHBS13C	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T
PepHBS13D1	C	R	T	C	T	T	P	A	Q	G	T	S	M	Y	P	S	C	C	C	T
PepHBS13D2	C	R	T	C	M	T	T	A	Q	G	T	S	M	Y	P	S	C	C	C	T
PepHBS14A	N	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	T	D	G	N	C	T	C	I
PepHBS14C	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N	C	T	C	I
PepHBS15C	K	P	S	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	A	R
PepHBS16AB	P	I	P	S	S	W	A	F	A	K	Y	L	W	E	W	A	S	V	R	F
PepHBS16C2	P	I	P	S	S	W	A	F	A	K	F	L	W	E	W	A	S	V	R	F
PepHBS16C	P	I	P	S	S	W	A	F	A	R	F	L	W	E	W	A	S	V	R	F
PepHBS16D	P	I	P	S	S	W	A	F	G	K	F	L	W	E	W	A	S	A	R	F
PepHBS17C	F	L	W	E	W	A	S	V	R	F	S	W	L	S	L	L	V	P	F	V
PepHBS17D	F	L	W	E	W	A	S	A	R	F	S	W	L	S	L	L	V	P	F	V
PepHBS18ABD	S	W	L	S	L	L	V	P	F	V	Q	W	F	V	G	L	S	P	T	V
PepHBS18C	S	W	L	S	L	L	V	P	F	V	Q	W	F	A	G	L	S	P	T	V
PepHBS19A	Q	W	F	V	G	L	S	P	T	V	W	L	S	A	I	W	M	M	W	Y
PepHBS19C	Q	W	F	A	G	L	S	P	T	V	W	L	S	V	I	W	M	M	W	Y
PepHBS20A	W	L	S	A	I	W	M	M	W	Y	W	G	P	S	L	Y	S	I	V	S
PepHBS20B	W	L	S	V	I	W	M	M	W	F	W	G	P	S	L	Y	N	I	L	S
PepHBS20C	W	L	S	V	I	W	N	M	W	Y	W	G	P	S	L	Y	N	I	L	S
PepHBS21A	W	G	P	S	L	Y	S	I	V	S	P	F	I	P	L	L	P	I	F	F
PepHBS21B	W	G	P	S	L	Y	N	I	L	S	P	F	M	P	L	L	P	I	F	F
PepHBS21C	W	G	P	S	L	Y	N	I	L	S	P	F	L	P	L	L	P	I	F	F
PepHBS21D	W	G	P	S	L	Y	S	I	L	S	P	F	L	P	L	L	P	I	F	F
PepHBS22CD	P	F	L	P	L	L	P	I	F	F	C	L	W	V	Y	I				

**Ejemplo 2**

Preparación de anticuerpo monoclonal establecido

## 5 (A) Preparación de anticuerpo monoclonal a partir de sobrenadante de cultivo

10 Cada uno de los hibridomas establecidos se cultivó en un medio libre de suero (Hybridoma-SFM, GIBCO) a 37 °C con una atmósfera de un 5 % de dióxido de carbono durante 72 a 96 horas. El medio de cultivo se aplicó a una columna de proteína A recombinante (GE Healthcare Bio-Science KK). El anticuerpo se eluyó de la columna usando un tampón a un pH de 5,5 para obtener el anticuerpo monoclonal purificado de la presente invención. Se obtuvieron aproximadamente 10 mg a partir de 500 ml del medio de cultivo.

## (B) Preparación de anticuerpo monoclonal a partir de ascitis

15 Se administró intraperitonealmente a ratones Balb/c de 4 a 6 semanas de edad, 0,5 ml de pristano por ratón y, 7 días después, cada uno de los hibridomas proliferados se inoculó intraperitonealmente para lograr la cantidad celular de  $5 \times 10^6$  por ratón. Se obtuvieron aproximadamente 15 ml de ascitis a partir de 5 individuos de ratones y, se obtuvo aproximadamente 10 mg de un anticuerpo a partir de 2 ml de ascitis. La purificación del anticuerpo monoclonal en la ascitis se llevó a cabo del mismo modo que en el anterior proceso de purificación descrito del mismo a partir del sobrenadante de cultivo.

**Ejemplo 3**

Anticuerpo monoclonal marcado con HRP

25 El marcado con HRP del anticuerpo se llevó a cabo usando EZ-Link Plus Activated Peroxidase de Pierce. Este método une HRP, al cual se le ha introducido grupo aldehído, a un grupo amino en la molécula del anticuerpo. El marcado se llevó a cabo según el protocolo proporcionado por el fabricante.

30 **Ejemplo 4**

En este Ejemplo 4, el antígeno HBs en la muestra de un paciente infectado por VHB se midió usando como anticuerpo/anticuerpos de captura para el ensayo sándwich el único anticuerpo de captura interna, el único anticuerpo de captura externa o la combinación del anticuerpo de captura interna y el anticuerpo de captura externa y usando como anticuerpo/anticuerpos de detección el único anticuerpo de detección interna, el anticuerpo de detección externa o la combinación del anticuerpo de detección interna y el anticuerpo de detección externa.

35 Se usó el anticuerpo 6G6 como anticuerpo de captura interna, el anticuerpo HBs136 como anticuerpo de captura externa, el anticuerpo S6F111 como anticuerpo de detección interna y el anticuerpo SF124CS como anticuerpo de detección externa. A una concentración de 4 µg/ml, se añadieron 100 µl del único anticuerpo 6G6, único anticuerpo HBs136 o el anticuerpo mezclado en el que se mezclaron cantidades iguales de anticuerpo 6G6 y anticuerpo HBs136 a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos (Costar 2592), y se incubaron a 4 °C durante la noche. Después de lavar la placa dos veces con 10 mM de tampón de fosfato, pH 7,3, que contenía 0,15 M de NaCl, 350 µl de 10 mM de tampón de fosfato que contenía un 0,5 % de caseinato de sodio se añadió a cada pocillo y el bloqueo se llevó a cabo a 37 °C durante 5 horas. Después de retirar la solución de bloqueo, se añadieron a cada pocillo 25 µl de tampón de reacción (pH 7,2) que contenía un 2% de Lauril sarcosinato de sodio (NLS) (WAKO) y 75 µl de una muestra individual normal o una muestra de VHB positivo, y la reacción se dejó procesar con agitación a una temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se siguió por 8 veces de lavado con 10 mM de tampón de fosfato, pH 7,3, que contenía un 0,05 % de Tween 20 (solución de lavado). Posteriormente, se diluyó anticuerpo SF124CS marcado con peroxidasa de rábano picante, anticuerpo SF111 o el anticuerpo mezclado en el que se mezclaron cantidades iguales de anticuerpo SF124CS y anticuerpo SF111 con 10 mM de tampón de fosfato, pH 7,3, que contenía BSA al 2%, un 1 % de suero de ratón y un 0,2 % de Triton X-100, y se añadieron 100 µl de la dilución a cada pocillo para dejar que la reacción proceda con agitación a una temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 8 veces con la solución de lavado, se añadieron 100 µl de una solución de sustrato (o-fenilenediamina, SIGMA) a cada pocillo, y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta que la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl ácido sulfúrico 2N a cada pocillo. Se midió la absorbancia (D.O) a 492 nm mediante un detector de TOSOH usando la absorbancia a 620 nm como el control. Los resultados se muestran en la tabla 2. Los resultados de la muestra normal se indicaron como D.O y los resultados de las muestras positivas de VHB se indicaron como Señal/Negativo (S/N) que se calculó mediante la división de la D.O de la muestra positiva en VHB por D.O de la muestra normal. Cuando la S/N no superaba 1, el resultado se consideraba como N.D. (no detectable). En la Tabla 2, Int represente el anticuerpo 6G6 y Ext represente el anticuerpo HBs136 que son los anticuerpos de captura, y Int representa el anticuerpo SF111 y Ext representa el anticuerpo SF124CS que son los anticuerpos de detección.

65 Cuando Int se usó únicamente como el anticuerpo de captura en el método para el análisis del antígeno HBs, el antígeno HBs en las muestras positivas de VHB 4, 5 y 6 no se pudieron medir. Además, cuando Int se usó únicamente como anticuerpo de detección en el método para el análisis del antígeno HBs, el antígeno HBs en las

5 muestras positivas de VHB 4, 5 y 6 no se pudieron medir, y los valores medidos de antígeno HBs en las muestras positivas de VHB 10 y 12 fueron extremadamente bajos. Por otra parte, cuando Ext se usó como el anticuerpo de captura y Ext se usó como el anticuerpo de detección; cuando Ext se usó como el anticuerpo de captura y Int + Ext se usaron como el anticuerpo de detección; cuando Int + Ext se usaron como el anticuerpo de captura y Ext se usó como el anticuerpo de detección; o cuando Int + Ext se usaron como el anticuerpo de captura y Int + Ext se usaron como el anticuerpo de detección; todas las muestras positivas en VHB se pudieron medir.

[Tabla 2]  
Anticuerpo de captura/anticuerpo de detección

Genotipo	Muestra ID	Int/Int	Int/Ext	Int/Int+Ext	Ext/Int	Ext/Ext	Ext/Int+Ext	Int+Ext/Int	Int+Ext/Ext	Int+Ext/Int+Ext
A	VHB-muestra positiva 1	14,0	40,9	30,2	16,9	14,3	23,8	14,8	21,2	18,0
A	VHB-muestra positiva 2	19,2	58,6	43,3	13,6	14,0	20,7	14,7	29,3	23,5
A	VHB-muestra positiva 3	8,6	18,4	15,5	9,9	8,3	13,6	8,5	10,0	10,2
B	VHB-muestra positiva 4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	> 125,0	> 73,2	N.D.	28,5	16,4
B	VHB-muestra positiva 5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	52,4	25,9	N.D.	13,5	7,1
B	VHB-muestra positiva 6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	> 125,0	53,3	N.D.	22,3	14,1
C	VHB-muestra positiva 7	42,1	> 111,1	> 76,9	36,0	42,8	50,0	20,6	31,8	16,7
C	VHB-muestra positiva 8	46,8	> 111,1	> 76,9	41,4	61,7	56,7	18,5	35,5	20,3
C	VHB-muestra positiva 9	16,5	76,4	45,7	21,0	24,3	30,8	10,6	23,5	14,1
D	VHB-muestra positiva 10	1,7	> 111,1	45,8	6,0	58,8	31,2	3,0	20,0	14,8
D	VHB-muestra positiva 11	> 66,7	> 111,1	42,4	> 54,5	89,9	> 73,2	13,8	21,3	14,9
D	VHB-muestra positiva 12	N.D.	34,8	20,6	1,8	8,0	6,6	1,4	13,4	8,5
-	Muestra normal D. O.	0,045	0,027	0,039	0,055	0,024	0,041	0,058	0,044	0,050

**Ejemplo 5**

En el Ejemplo 5, el antígeno HBs se midió con las condiciones de anticuerpo HBs-negativo y anticuerpo HBs-positivo en el método para el análisis de antígeno HBs usando combinaciones de los anticuerpos de captura y anticuerpos de detección, cuyas combinaciones se usaron en el Ejemplo 4. Más particularmente, el plasma de anticuerpo HBs-positivo con un título de anticuerpos alto se añadió a muestras de prueba de antígeno HBs-positivo y las influencias del mismo se investigaron.

Se usó el anticuerpo 6G6 como anticuerpo de captura interna, el anticuerpo HBs136 como anticuerpo de captura externa, el anticuerpo S6F111 como anticuerpo de detección interna y el anticuerpo SF124CS como anticuerpo de detección externa. A una concentración de 4 µg/ml, se añadieron 100 µl de una solución del único anticuerpo 6G6, único anticuerpo HBs136 o la mezcla de cantidades iguales de anticuerpo 6G6 y anticuerpo HBs136 a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos (Costar 2592) y se incubaron a 4 °C durante la noche. Después de lavar la placa dos veces con 10 mM de tampón de fosfato, pH 7,3, que contenía 0,15 M de NaCl, 350 µl de 10 mM de tampón de fosfato que contenía un 0,5 % de caseinato de sodio se añadió a cada pocillo y el bloqueo se llevó a cabo a 37 °C durante 5 horas. Después de retirar la solución de bloqueo, se añadieron a cada pocillo 25 µl de tampón de reacción (pH 7,2) que contenía 2 % de NLS (WAKO) y 75 µl de una muestra normal o una muestra positiva en VHB diluidas con plasma de anticuerpo HBs- negativo o anticuerpo HBs-positivo y la reacción se dejó proceder con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se siguió por 5 veces de lavado con 10 mM de tampón de fosfato, pH 7,3, que contenía un 0,05 % de Tween 20 (solución de lavado). Posteriormente, se diluyó anticuerpo SF111 marcado con peroxidasa de rábano picante, anticuerpo SF124CS o el anticuerpo mezclado, en donde se han mezclado cantidades iguales de estos anticuerpos con 10 mM de tampón de fosfato, pH 7,3, que contenía BSA al 2%, un 1 % de suero de ratón y un 0,2 % de Triton X-100, y se añadieron 100 µl de la dilución a cada pocillo para dejar que la reacción proceda con agitación a una temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 5 veces con la solución de lavado, se añadieron 100 µl de una solución de sustrato (o-fenilenediamina, SIGMA) a cada pocillo, y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta que la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl ácido sulfúrico 2N a cada pocillo. Se midió la absorbencia (D.O) a 492 nm mediante un detector de TOSOH usando la absorbencia a 620 nm como el control. Los resultados se muestran en la tabla 3. Los porcentajes de los valores obtenidos a partir de las muestras diluidas con el plasma de anticuerpo HBs-positivo en relación con los valores (definidos como 100 %) obtenidos a partir de las muestras diluidas con el plasma de anticuerpo HBs-negativo se representaron como inhibición (%). En la Tabla 3, Int represente el anticuerpo 6G6 y Ext representa el anticuerpo HBs136 que son los anticuerpos de captura (1º Ab) e Int representa el anticuerpo SF111 Ext representa el anticuerpo SF124CS que son los anticuerpos de detección (2º Ab).

Quando Ext se usó únicamente como el anticuerpo de captura en el método para analizar antígeno HBs, todos los valores medidos no superan el 63,5 % en las muestras positivas en VHB 1 y 8, y no superan el 44,2 % en la muestra positiva en VHB 3. Por otra parte, cuando Int o Int + Ext se usaron como el anticuerpo de captura en el método para analizar antígeno HBs, todos los valores medidos no eran inferiores al 72,3 % en las muestras positivas en VHB 1 y 8 y no eran inferiores al 59,4 % en la muestra positiva en VHB 3. De este modo, se sugirió que el método para analizar antígeno HBs usando Int o Int + Ext como anticuerpo de captura era menos probable que se viese afectador por el anticuerpo anti-HBs en el cuerpo de un paciente.

[Tabla 3]

		VHB-muestra positiva 1			VHB-muestra positiva 3			VHB-muestra positiva 8		
1er Ab	2º Ab	Ab de HBs (-)	Ab de HBs (+)	Inhibición (%)	Ab de HBs (-)	Ab de HBs (+)	Inhibición (%)	Ab de HBs (-)	Ab de HBs (+)	Inhibición (%)
Int	Int	0,355	0,346	97,4	0,123	0,088	69,6	1,034	1,094	105,8
	Ext	0,279	0,236	84,0	0,061	0,047	73,7	2,019	1,461	72,3
	Int+Ext	0,389	0,350	89,8	0,109	0,088	79,2	1,991	1,573	78,9
Ext	Int	0,316	0,199	62,2	0,135	0,061	41,8	0,404	0,256	62,8
	Ext	0,083	0,048	60,4	0,030	0,010	35,4	0,230	0,125	55,1
	Int+Ext	0,267	0,171	63,5	0,117	0,054	44,2	0,455	0,279	61,0
Int+Ext	Int	0,499	0,428	85,3	0,156	0,096	59,4	1,334	1,255	93,9
	Ext	0,264	0,194	73,6	0,052	0,035	67,6	1,556	1,230	79,1
	Int+Ext	0,497	0,409	81,9	0,146	0,095	63,4	1,815	1,619	89,1

Los resultados en la anterior Tabla 2 y Tabla 3 se resumen en la Tabla 4. En la Tabla 2, las combinaciones de los anticuerpos con las que todas las muestras podrían medirse se representan mediante O. En la tabla 3, las combinaciones de los anticuerpos con los que los valores medidos no son inferiores al 80 % en la muestra positiva en VHB 1, con los que los valores medidos no son inferiores al 60 % en la muestra positiva en VHB 3 o con los que los valores medidos no son inferiores al 80 % en la muestra positiva en VHB 8 en el Ejemplo 5 se representan mediante O.

[Tabla 4]

Anticuerpo de captura	Anticuerpo de detección	Tabla 2	Tabla 3		
			VHB-muestra positiva 1	VHB-muestra positiva 3	VHB-muestra positiva 8
Int	Int	X	O	O	O
	Ext	X	O	O	X
	Int+Ext	X	O	O	X
Ext	Int	X	X	X	X
	Ext	O	X	X	X
	Int+Ext	O	X	X	X
Int+Ext	Int	X	O	X	O
	Ext	O	X	O	X
	Int+Ext	O	O	O	O

5 Tal como se muestra en la Tabla 4, se descubrió que la aparición de falso negativo disminuyó usando Int + Ext como el anticuerpo de captura y usando Int + Ext como el anticuerpo de detección, de modo que el desarrollo de un método para analizar antígeno HBs que es menos probable que se vea afectado por el anticuerpo anti-HBs en el cuerpo de un paciente es posible.

**Aplicabilidad industrial**

- 10 Mediante el uso del método de la presente invención para analizar antígeno HBs en la detección de infección de VHB, es posible analizar una muestra de prueba infectada por VHB que no podría analizarse mediante el método convencional. También es posible cuantificar antígeno HBs en un paciente infectado por VHB con más exactitud para ayudar a comprender el estado de enfermedad del paciente.
- 15 La presente invención se ilustró anteriormente en el presente documento haciendo referencia a realizaciones específicas, pero modificaciones y mejoras que son obvias para los expertos en la materia se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

**Listado de secuencias**

- 20 <110> Instituto de Ciencias Naturales Avanzado, Inc.
- <120> Método de análisis para antígeno de superficie del virus de la hepatitis B
- 25 <130> ALS-793
- <150> JP 2006-294906
- <151> 30/10/2006
- 30 <150> JP 2007-133539
- <151> 18/05/2007
- <160> 57
- 35 <170> PatentIn versión 3. 1
- <210> 1
- <211> 226
- <212> PRT
- 40 <213> Virus de la Hepatitis B
- <400> 1



ES 2 642 203 T3

Met 1 Glu Asn Ile Thr 5 Ser Gly Phe Leu Gly 10 Pro Leu Leu Val Leu Gln 15  
 Ala Gly Phe Phe 20 Leu Leu Thr Arg Ile 25 Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu 30  
 Asp Ser Trp 35 Trp Thr Ser Leu Asn Phe 40 Leu Gly Gly 45 Ser Pro Val Cys  
 Leu Gly 50 Gln Asn Ser Gln Ser 55 Pro Thr Ser Asn His 60 Ser Pro Thr Ser  
 Cys 65 Pro Pro Ile Cys Pro 70 Gly Tyr Arg Trp Met 75 Cys Leu Arg Arg Phe 80  
 Ile Ile Phe Leu Phe 85 Ile Leu Leu Leu Cys 90 Leu Ile Phe Leu Ile Val 95  
 Leu Leu Asp Tyr 100 Gln Gly Met Leu Pro 105 Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly 110  
 Ser Thr Thr Thr 115 Ser Thr Gly Pro 120 Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala  
 Gln Gly 130 Asn Ser Met Phe Pro 135 Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp  
 Gly 145 Asn Cys Thr Cys Ile 150 Pro Ile Pro Ser Ser 155 Trp Ala Phe Ala Lys 160  
 Tyr Leu Trp Glu Trp 165 Ala Ser Val Arg Phe 170 Ser Trp Leu Ser Leu Leu 175  
 Val Pro Phe Val 180 Gln Trp Phe Val Gly 185 Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu 190  
 Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr 200 Trp Gly Pro Ser Leu 205 Tyr Ser Ile  
 Val Ser 210 Pro Phe Leu Pro Leu 215 Leu Pro Ile Phe Phe 220 Cys Leu Trp Val  
 Tyr Ile 225

5 <210>2  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B  
 <400>2

ES 2 642 203 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  
 20

5 <210>3  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 3

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

Ala Gly Phe Phe  
 20

10 <210>4  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 15 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 4

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

Ala Gly Phe Phe  
 20

20 <210>5  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 25 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 5

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

Ala Gly Phe Phe  
 20

30 <210>6  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

35 <400>6

Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu  
 1 5 10 15

Thr Ile Pro Gln  
 20

<210>7

ES 2 642 203 T3

<211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

5 <400> 7

Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Lys Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Thr Ile Pro Gln  
 20

<210>8  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

10 <400> 8

Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp  
 1 5 10 15  
 Thr Ser Leu Asn  
 20

<210>9  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

20 <400> 9

Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro  
 1 5 10 15  
 Val Cys Leu Gly  
 20

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

30 <400> 10

Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Val Cys Leu Gly  
 20

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

35 <400> 11

40

ES 2 642 203 T3

Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro  
1 5 10 15

Thr Cys Pro Gly  
20

5

<210> 12  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B  
<400> 12

Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr  
1 5 10 15

10

Val Cys Leu Gly  
20

15

<210> 13  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B  
<400> 13

Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro  
1 5 10 15

20

Thr Ser Asn His  
20

25

<210> 14  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B  
<400> 14

Phe Leu Gly Gly Thr Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Gln  
1 5 10 15

30

Ile Ser Ser His  
20

35

<210> 15  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B  
<400> 15

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

Thr Ser Asn His  
20

ES 2 642 203 T3

5 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 16

Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro  
 1 5 10 15

Thr Ser Asn His  
 20

10 <210> 17  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

15 <400> 17

Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro  
 1 5 10 15

Pro Ile Cys

20 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

25 <400> 18

Gln Asn Ser Gln Ser Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Thr Cys Cys Pro  
 1 5 10 15

Pro Ile Cys

30 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

35 <400> 19

Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys  
 1 5 10 15

Leu Arg Arg Phe  
 20

40 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 20

ES 2 642 203 T3

Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys  
 1 5 10 15

Leu Arg Arg Phe  
 20

5 <210>21  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B  
 <400> 21

Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile  
 1 5 10 15

10 Leu Leu Leu Cys  
 20

15 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B  
 <400> 22

Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Cys Ile  
 1 5 10 15

20 Leu Leu Leu Cys  
 20

25 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B  
 <400> 23

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Ile Val  
 1 5 10 15

Leu Leu Asp Tyr  
 20

30 <210> 24  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B  
 35 <400> 24

Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val  
 1 5 10 15

Cys Pro Leu Leu  
 20

<210> 25

ES 2 642 203 T3

<211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

5 <400> 25

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Gly

<210> 26  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

10

<400> 26

15

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Gly

<210> 27  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

20

<400> 27

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Gly

25

<210> 28  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

30

<400> 28

Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr  
 1 5 10 15

Pro Ala Gln Gly  
 20

35

<210> 29  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

40

<400> 29

ES 2 642 203 T3

Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile  
1 5 10 15

Pro Ala Gln Gly  
20

5 <210> 30  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 30

Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr  
1 5 10 15

Pro Ala Gln Gly  
20

10 <210> 31  
<211> 20  
<212> PRT  
15 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 31

Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr  
1 5 10 15

Thr Ala Gln Gly  
20

20 <210> 32  
<211> 20  
<212> PRT  
25 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 32

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

Cys Cys Cys Thr  
20

30 <210> 33  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B

35 <400> 33

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

Cys Cys Cys Thr  
20

<210> 34



ES 2 642 203 T3

<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B

5 <400> 34

Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser  
1 5 10 15  
Cys Cys Cys Thr  
20

10 <210> 35  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B

15 <400> 35

Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser  
1 5 10 15  
Cys Cys Cys Thr  
20

20 <210> 36  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 36

Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser  
1 5 10 15  
Cys Cys Cys Thr  
20

25 <210> 37  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 37

Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn  
1 5 10 15  
Cys Thr Cys Ile  
20

35 <210> 38  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B

40 <400> 38

ES 2 642 203 T3

Thr Ser Met Phe Pro Ser Oys Oys Oys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn  
 1 5 10 15

Oys Thr Oys Ile  
 20

5 <210> 39  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B  
 <400> 39

Lys Pro Ser Asp Gly Asn Oys Thr Oys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp  
 1 5 10 15

Ala Phe Ala Arg  
 20

10 <210> 40  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 15 <213> Virus de la Hepatitis B  
 <400> 40

Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Arg Phe  
 20

20 <210>41  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 25 <213> Virus de la Hepatitis B  
 <400> 41

Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Phe Leu Trp Glu Trp Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Arg Phe  
 20

30 <210> 42  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B  
 35 <400> 42

Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Arg Phe  
 20

ES 2 642 203 T3

<210> 43  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

5 <400> 43

Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu Trp Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Arg Phe  
 20

<210> 44  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

15 <400> 44

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Val Pro Phe Val  
 20

<210> 45  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

25 <400> 45

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Val Pro Phe Val  
 20

<210> 46  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

30 <400> 46

Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Pro Thr Val  
 20

<210> 47  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

40 <400> 47

ES 2 642 203 T3

Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Ala Gly Leu  
1 5 10 15

Ser Pro Thr Val  
20

5 <210> 48  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B  
  
<400> 48

Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp  
1 5 10 15

10 Met Met Trp Tyr  
20

15 <210> 49  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B  
  
<400> 49

Gln Trp Phe Ala Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp  
1 5 10 15

20 Met Met Trp Tyr  
20

25 <210> 50  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B  
  
<400> 50

Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr  
1 5 10 15

Ser Ile Val Ser  
20

30 <210>51  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B  
  
35 <400> 51

Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Phe Trp Gly Pro Ser Leu Tyr  
1 5 10 15

Asn Ile Leu Ser  
20

40 <210> 52  
<211> 20

ES 2 642 203 T3

<212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 52

5  
 Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Asn Ile Leu Ser  
 20

<210> 53  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 53

10  
 Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Ile Phe Phe  
 20  
 15

<210> 54  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 54

20  
 Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Met Pro Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Ile Phe Phe  
 20  
 25

<210> 55  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 55

30  
 Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Ile Phe Phe  
 20  
 25

<210> 56  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 56

40

ES 2 642 203 T3

Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu  
1 5 10 15

Pro Ile Phe Phe  
20

<210> 57

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 57

10 Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Oys Leu Trp Val Tyr Ile  
1 5 10 15

## REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBs), **caracterizado por que** usa como sondas de captura al menos una sonda de captura interna, en el que dicha sonda de captura interna se une a un péptido, que consiste en aminoácidos, que se encuentran entre la posición 51 y la posición 60 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1; y al menos una sonda de captura externa, en donde dicha sonda de captura externa se une a un péptido, que consiste en aminoácidos que se encuentran entre la posición 111 y la posición 130 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1; y que usa como sondas de detección al menos una sonda de detección interna, en donde dicha sonda de detección interna se une a un péptido, que consiste en aminoácidos que se encuentran entre la posición 51 y la posición 69 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1 y al menos una sonda de detección externa, en donde dicha sonda de detección externa se une a un péptido, que consiste en aminoácidos que se encuentran entre la posición 98 y la posición 156 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1.
2. El método para analizar antígeno HBs según la reivindicación 1, en el que dichas sondas son anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos.
3. El método para analizar antígeno HBs según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo monoclonal de captura interna se selecciona a partir del grupo que consiste en anticuerpo FERM BP-10117, anticuerpo FERM BP-10702, anticuerpo FERM BP-10700 y anticuerpo FERM BP-10698; dicho anticuerpo monoclonal de detección interna se selecciona a partir del grupo que consiste en anticuerpo FERM BP-10117, anticuerpo FERM BP-10702, anticuerpo FERM BP-10700 y anticuerpo FERM BP-10698; dicho anticuerpo monoclonal de captura externa se selecciona a partir del grupo que consiste en FERM BP-10699, anticuerpo FERM BP-10703, anticuerpo FERM BP-10701 y anticuerpo FERM BP-10697; dicho anticuerpo monoclonal de detección externa se selecciona a partir del grupo que consiste en anticuerpo FERM BP-10699, anticuerpo FERM BP-10703, anticuerpo FERM BP-10701 y anticuerpo FERM BP-10697; dicho anticuerpo monoclonal de captura interna y dicho anticuerpo monoclonal de detección interna son anticuerpos distintos; y dicho anticuerpo monoclonal de captura externa y dicho anticuerpo monoclonal de detección externa son anticuerpos distintos.
4. Un kit para analizar antígeno HBs, **caracterizado por que** comprende un portador de anticuerpos inmovilizados que comprende como sondas de captura al menos una sonda de captura interna, en donde dicha sonda de captura interna se une a un péptido, que consiste en aminoácidos que se encuentran entre la posición 51 y la posición 60 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1; y al menos una sonda de captura externa, en donde dicha sonda de captura externa se une a un péptido, que consiste en aminoácidos que se encuentran entre la posición 111 y la posición 130 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1; y un reactivo que comprende como sondas de detección al menos una sonda de detección interna, en donde dicha sonda de detección interna se une a un péptido, que consiste en aminoácidos que se encuentran entre la posición 51 y la posición 69 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1 y al menos una sonda de detección externa, en donde dicha sonda de detección externa se une a un péptido, que consiste en aminoácidos que se encuentran entre la posición 98 y la posición 156 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1.

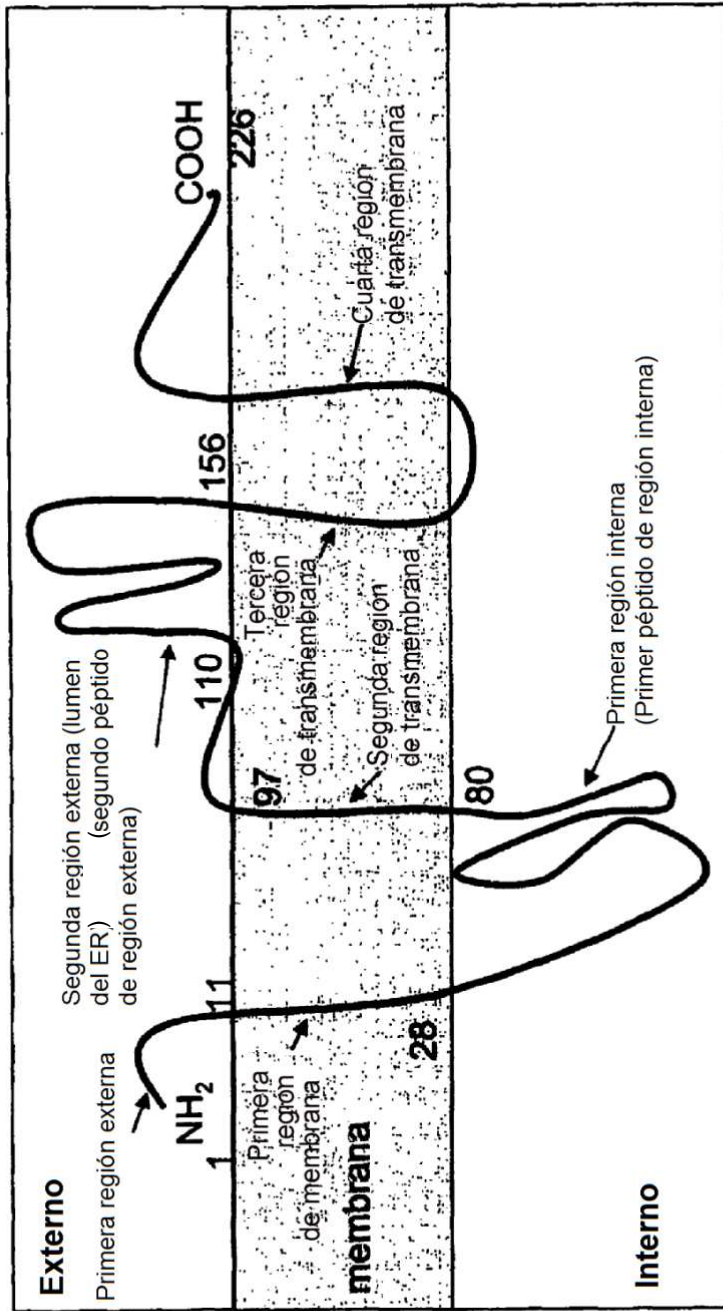


Fig.1