



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 852**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/576 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98935359 .4**
86 Fecha de presentación : **04.08.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **0967484**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.1999**

54 Título: **Métodos para detectar o analizar virus.**

30 Prioridad: **04.08.1997 JP 9-209515**
04.08.1997 JP 9-209522
31.07.1998 JP 10-218136

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

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

72 Inventor/es: **Aoyagi, Katsumi;**
Ohue, Chiharu;
Iida, Kumiko;
Kimura, Tatsuji y
Yagi, Shintaro

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 286 852 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

Métodos para detectar o analizar virus.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a métodos para detectar o medir virus y a los reactivos para ello.

Técnica anterior

10

En la actualidad se están usando diversos métodos de detección de virus para detectar la presencia de virus infecciosos en sangre o en productos derivados de la sangre y para identificar la presencia de virus en pacientes con enfermedades. Sin embargo, estos métodos no siempre son muy sensibles o específicos aunque la sensibilidad y la especificidad pueden variar con el tipo de virus que se ha de detectar. Incluso cuando son lo suficientemente sensibles y específicos, estos métodos frecuencia son caros y requieren procedimientos largos como son los de cultivo y aislamiento de un virus. Como antecedente de la presente invención, la hepatitis de tipo C (hepatitis C) se mencionará con detalle más adelante.

15

El agente causante de la hepatitis C se ha desconocido durante mucho tiempo, pero cuando el gen del virus se clonó (*Science* 244:359-362, 1989) y se desarrolló un método de diagnóstico por medición de anticuerpos usando un antígeno recombinante generado tomando como base dicho gen (*Science* 244:362-364, 1989; Publicación de Patente japonesa (Kohyo) 2 (1990)-500880), se descubrió que la hepatitis C es una enfermedad infecciosa cuyo agente causante es el virus de la hepatitis C (HCV) que se transmite a través de la sangre y de productos derivados de la sangre como ruta principal de su infección. Con el desarrollo del denominado método de ensayo con anticuerpos de segunda generación, en el que se han añadido un antígeno recombinante de la nucleocápsida (del inglés, "core") y un antígeno recombinante NS3, es ahora posible identificar virtualmente a todos los pacientes con HCV mediante ensayo de sus sueros. Esto ha hecho posible erradicar casi la totalidad de las infecciones por HCV transmitidas a través de donaciones de sangre en Japón.

20

25

Sin embargo, al igual que sucede en otras infecciones víricas comunes tales como las producidas por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), después de la infección existe un período de tiempo hasta la aparición de los anticuerpos, el llamado período ventana, en el que un virus no es identificable con los métodos ensayos existentes. Esto significa que el riesgo de una infección secundaria todavía existe, debido a componentes de transmisión hemática que no pueden ser identificados con los métodos de ensayo con anticuerpos, en zonas en las que la venta de sangre es legal o en algunas regiones de Japón. El método de ensayo con anticuerpos también presenta un inconveniente en cuanto que no es capaz de distinguir a una persona ya recuperada de una infección de otra persona que está en la fase activa de la infección, debido al principio del ensayo.

30

35

Actualmente se usa interferón (IFN) para el tratamiento de la hepatitis C. Algunos investigadores insisten sin embargo, en que la eficacia de la terapia se puede evaluar únicamente midiendo el título del anticuerpo contra HCV porque el título desciende seis meses después de la eliminación del HCV por acción del IFN. Sin embargo, ya que el título del anticuerpo comienza descender sólo después de la disminución de la estimulación producida por el antígeno o varios meses después de la eliminación del antígeno, es imposible determinar si la administración de IFN produjo la eliminación del HCV, en el momento que se quiere y con la precisión deseada, únicamente con el ensayo de determinación del anticuerpo. Por lo tanto, con el fin de hacer el seguimiento de la terapia, es necesario detectar el HCV *per se* además del anticuerpo contra HCV.

40

45

Fue difícil establecer un método para detectar directamente la partícula vírica (antígeno vírico) del HCV porque los niveles del virus en sangre son muy bajos comparados con los de otros virus tales como el virus de la hepatitis B (HBV) y porque el virus no se puede propagar *in vitro* o usando un animal, etc., como hospedador. Por lo tanto, en lugar de detectar el antígeno vírico, se desarrollaron métodos para detectar el RNA genómico del virus, tales como el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*Science* 230:1350-1354, 1985) y el método que utiliza sondas de DNA ramificado. Pero, el método para detectar genomas víricos presenta varios problemas cuando se compara con el método para detectar antígenos víricos.

55

Primero, se ha señalado que, ya que la sustancia que ha de ser detectada es un RNA, el cual no es muy estable durante su almacenamiento, el procedimiento de congelación y descongelación del suero puede producir una disminución en el valor medido. Por lo tanto, las muestras de suero que se van a someter al ensayo se deben almacenar con más cuidado que cuando se usan en otros métodos de ensayo. Se debe de tener también un cuidado extremo en el transporte de las muestras.

60

Aunque los métodos de ensayo que implican el uso de un método de PCR son los más sensibles para detectar fragmentos génicos, presentan problemas en cuanto a que: la transcripción inversa de un RNA genómico a un DNA molde suele ir acompañada de pérdidas, por lo que se requiere una gran habilidad para obtener un valor cuantitativo exacto y, ya que la amplificación es un principio importante en estos métodos, se puede producir una incidencia alta de falsos positivos en caso de contaminación y por ello el procesamiento de un número grande de muestras al mismo tiempo es imposible. Además, incluso los métodos que se postulan que son un procedimiento sencillo, tardan 2 horas o más en el pretratamiento de las muestras y son complicados ya que se requieren procedimientos de centrifugación y

65

procedimientos similares repetidos. Además, estos procedimientos complicados conducen a mayores posibilidades de contaminación y por lo tanto a mayores posibilidades de obtener resultados falsos positivos. Por otra parte, el método que usa sondas de DNA ramificado posee una sensibilidad de detección baja y además se tarda aproximadamente 20 horas antes de obtener los resultados del ensayo (Igaku to Yakugaku [*Medicine and Pharmacology*] 31:961-970, 1994), y por lo tanto ese método deja mucho que desear en cuanto a su sensibilidad y tiempo de procesamiento.

Con el fin de solucionar los problemas anteriormente mencionados, asociados con los métodos para detectar genomas víricos, se desarrollaron métodos que implican la detección directa de un antígeno vírico. Como se muestra en la publicación de Patente japonesa no examinada (Kokai) Núm. 8 (1996-29427), se desarrolló un método que detecta el antígeno de la nucleocápsida de HCV en el suero usando un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno de la nucleocápsida. Según se informa en Tanaka y col., *Journal of Hepatology* 23:742-745, 1995 y en Fujino y col., Igaku to Yakugaku [*Medicine and Pharmacology*] 36:1065-1070, 1996, se ha demostrado que los métodos para detectar el antígeno de la nucleocápsida en suero tienen utilidad clínica al igual que los métodos anteriormente mencionados para detectar el genoma vírico. Sin embargo, todavía existen algunos problemas importantes que necesitan solucionarse al igual que en los métodos para detectar el genoma vírico.

Uno de esos problemas es que la sensibilidad, comparada con la del método de PCR, es tan baja que no se puede usar como un método definitivo de ensayo para el escrutinio de sueros. Tanaka y col., *Journal of Hepatology* 23:742-745, 1995, indicaron que el límite de detección del RNA de HCV es de 10^4 - 10^5 copias/ml. Fujino y col., Igaku to Yakugaku [*Medicine and Pharmacology*] 36:1065-1070, 1996, han informado que este método ha mostrado una tasa de resultados positivos del 67% en un total de 102 sueros de pacientes con hepatitis C crónica antes de ser tratados, que se había encontrado que eran RNA-positivos mediante el método de detección, más sensible, de CRT-PCR (CTR = transcripción inversa competitiva) (del inglés, "*Competitive Reverse Transcription*"). Es decir, en términos de sensibilidad, ese método va muy por detrás del método de CRT-PCR que es más sensible.

Además, el complicado procedimiento de tratamiento de las muestras necesario para la medición y el tiempo prolongado que conlleva, plantea problemas cuando se usa en escrutinios. Así pues, el método requiere un procedimiento de múltiples etapas para el tratamiento de las muestras (sueros) que comprende: tratamiento con polietilenglicol (4°C, 1 h) para concentrar las partículas víricas y retirar los componentes del suero; centrifugación (15 min); retirada de los sobrenadantes; tratamiento con urea; tratamiento con álcali (37°C, 30 min); adición del agente neutralizante y procedimientos similares. Además, el procedimiento de dispersar con urea el precipitado que presenta una viscosidad aumentada debido al tratamiento con PEG, requiere una gran habilidad. Con el fin de obtener un resultado reproducible, se requiere por lo tanto una gran habilidad y además se necesita un mínimo de 2 horas de tratamiento. Además de esto, los procedimientos tales como la centrifugación, retirada de sobrenadantes, etc., no son susceptibles a la automatización y hacen que sea muy difícil el tratamiento simultáneo de un gran número de muestras. Por lo tanto, también desde el punto de vista de la facilidad de manejo, el método no es adecuado para aplicaciones que requieren el tratamiento de un gran volumen de muestras como sucede en los ensayos de escrutinio.

Por otra parte, el sistema de detección de antígenos víricos es superior al método altamente sensible de PCR, en los siguientes puntos. Así, ese sistema es muy tolerante con la contaminación porque no incluye ningún procedimiento de amplificación excesiva en la etapa de detección. Además, ya que lo que se pretende es detectar una proteína antigénica, que es relativamente estable, en lugar de un RNA muy poco estable, no requiere un cuidado excesivo en el almacenamiento de las muestras, tampoco requiere un equipamiento especial tal como el ultracongelador que se necesita para las muestras que han de ser detectadas por PCR, y el transporte de las muestras también es más fácil.

Estas características son adecuadas para aplicaciones en las que se mide un gran número de muestras, como es el caso de la industria de productos derivados de la sangre o de los ensayos de chequeos sanitarios. Sin embargo, debido a que el método descrito para detectar el antígeno de la nucleocápsida, según se ha indicado en lo que antecede, no es susceptible a la automatización y tiene una sensibilidad tan baja que no puede ser un patrón oro en aplicaciones que requieren una sensibilidad alta, como es el caso de la industria de productos derivados de la sangre, no se puede aplicar en ensayos que manejan un gran número de muestras tales como son los escrutinios, y no puede sacar el mejor partido de sus características ventajosas con respecto al método de PCR. Además, los métodos de ensayo clínicamente útiles deben siempre encarar los retos de sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, facilidad de manejo y bajo coste, y se necesitan esfuerzos continuos para satisfacer estos retos lo más posible. En lo que respecta a la detección de otros antígenos víricos diferentes de los de HCV, especialmente para usar en escrutinios en los que se manejan un gran número de muestras, existen muchos métodos que no se ponen en práctica porque tienen una sensibilidad baja, comparados con el método de PCR, o porque el antígeno deseado podría no quedar totalmente expuesto.

Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para detectar diferentes antígenos víricos, incluyendo un método para detectar el antígeno de HCV, que es adecuado para tratar un número grande de muestras, como es el caso de los escrutinios realizados en la industria de productos derivados de la sangre y en chequeos sanitarios. En otras palabras, el objetivo de la presente invención es proporcionar el sistema de detección de diferentes antígenos víricos, incluyendo un método para detectar el antígeno de HCV que tiene una sensibilidad y una especificidad equivalentes a las del método de PCR, que permite un pretratamiento sencillo, o que se puede automatizar fácilmente sin pretratamiento. Las realizaciones preferidas de la presente invención se explicarán ahora en lo que viene a continuación, haciendo principal referencia al HCV.

ES 2 286 852 T3

De acuerdo con la primera realización (1) de la presente invención, se proporciona un medio para detectar o determinar el HCV rompiendo la partícula del virus, exponiendo el antígeno vírico en su totalidad, rompiendo los anticuerpos, en caso de estar presentes, dirigidos contra el antígeno vírico, y detectando o determinando el antígeno vírico.

5

Así pues, la presente invención proporciona (I) un método para tratar una muestra que contiene virus, caracterizado por el tratamiento de una muestra que contiene virus con una disolución de tratamiento que contiene (1) un tensioactivo aniónico y (2) un tensioactivo anfótero, un tensioactivo no iónico o un desnaturalizante de proteínas.

10

La presente invención también proporciona (II) un método para tratar una muestra que contiene virus, caracterizado por el tratamiento de una muestra que contiene virus con una disolución de tratamiento que contiene (1) un tensioactivo aniónico, (2) un tensioactivo anfótero y (3) un tensioactivo no iónico o un desnaturalizante de proteínas.

15

La presente invención también proporciona (III) un método para tratar una muestra que contiene virus, caracterizado por el tratamiento de una muestra que contiene virus con una disolución de tratamiento que contiene (1) un tensioactivo aniónico, (2) un tensioactivo anfótero, (3) un tensioactivo no iónico y (4) un desnaturalizante de proteínas.

20

La presente invención también proporciona (IV) un método de ensayo para virus caracterizado por usar un método de tratamiento de muestras según uno cualquiera de los apartados de (I) a (III) y hacer reaccionar una muestra con una sonda que reconoce específicamente un antígeno vírico, para detectar o cuantificar la presencia del antígeno vírico.

25

La presente invención también proporciona un kit, un kit analítico o un reactivo de diagnóstico para determinar la presencia o ausencia de un virus en una muestra, que es para uso en el método de inmunoensayo (IV) anteriormente mencionado y que comprende un tensioactivo aniónico.

30

La presente invención también proporciona un kit, un kit analítico o un reactivo de diagnóstico para determinar la presencia o ausencia de un virus en una muestra, que es para uso en el método de inmunoensayo (IV) anteriormente mencionado y que comprende un anticuerpo monoclonal que se describe más adelante.

35

Según la primera realización (2) de la presente invención, se proporciona un medio para detectar o determinar un virus rompiendo la partícula del virus, exponiendo que el antígeno vírico en su totalidad, rompiendo anticuerpos, en caso de estar presentes, dirigidos contra el antígeno vírico, y detectando o determinando el antígeno vírico.

Así pues, la presente invención proporciona (V) un método para tratar una muestra que contiene virus, caracterizado por el tratamiento de una muestra que contiene virus con una disolución de tratamiento que contiene (1) un ion caotrópico y (2) un agente acidificante.

40

La presente invención también proporciona (VI) un método para tratar una muestra que contiene virus, caracterizado por el tratamiento de una muestra que contiene virus con una disolución de tratamiento que contiene (1) un ion caotrópico, (2) un agente acidificante y (3) un tensioactivo no iónico.

45

La presente invención también proporciona (VII) método de ensayo para virus, caracterizado por usar un método de tratamiento de muestras según los anteriores apartados (V) y (VI) y hacer reaccionar una muestra con una sonda que reconoce específicamente un antígeno vírico, para detectar o cuantificar la presencia del antígeno vírico.

La presente invención también proporciona un kit, un kit analítico o un reactivo de diagnóstico para determinar la presencia o ausencia de un virus en una muestra, que es para uso en el anterior método (VII) y que comprende un agente caotrópico.

50

Según la segunda realización de la presente invención, se proporciona un método para detectar o determinar un antígeno vírico durante el periodo ventana en el que los anticuerpos dirigidos contra dicho virus no se han generado todavía. En este método, es suficiente romper la partícula vírica para exponer el antígeno vírico y se necesita romper los anticuerpos dirigidos contra el antígeno vírico en la sangre.

55

Así pues, la presente invención proporciona un método de ensayo para virus caracterizado por la medición de un antígeno vírico basada en su unión con una sonda en presencia de un tensioactivo que contiene un grupo alquilo de 10 o más átomos de carbono y una amina secundaria, terciaria o cuaternaria, o de un tensioactivo no iónico que tiene un equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) (del inglés "*Hydrophilic/Lipophilic Balance*") de 12-14, o de ambos.

60

Además, el HCV, que es un virus con RNA, y el HBV, que es un virus con DNA, son virus que forman partículas víricas que tienen una estructura que comprende una proteína estructural que encapsula un RNA genómico o un DNA genómico y una proteína de membrana o una membrana lipídica que lo rodea. En cada una de las realizaciones, usando un método de tratamiento de la presente invención, se proporciona la detección o determinación de un virus caracterizada por romper una partícula vírica no solamente de HCV o de HBV sino también de un virus que presenta una estructura similar a la de ellos, exponiendo el antígeno vírico en su totalidad y detectando o determinando dicho antígeno.

65

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración del SDS añadido sobre el tratamiento de las muestras. Se usaron sueros procedentes de individuos humanos, normales y sanos (normales) y los sueros 13 y 50 de un panel de sueros positivos al RNA de HCV.

La Fig. 2 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración del CHAMPS añadido sobre el tratamiento de las muestras. Se usaron sueros procedentes de individuos humanos, normales y sanos (normales) y los sueros 13 y 50 de un panel de sueros positivos al RNA de HCV.

La Fig. 3 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración de la urea añadida sobre el tratamiento de las muestras. Se usaron sueros procedentes de individuos humanos, normales y sanos (normales) y los sueros 13, 44 y 50 de un panel de sueros positivos al RNA de HCV.

La Fig. 4 es una gráfica que muestra el efecto del Tritón X100 añadido sobre el tratamiento de las muestras. Se usaron sueros procedentes de individuos humanos, normales y sanos (normales) y los sueros 13, 44 y 50 del panel de sueros positivos al RNA de HCV.

La Fig. 5 es una gráfica que muestra el efecto de la temperatura durante el tratamiento de las muestras. Se usaron sueros procedentes de individuos humanos, normales y sanos (normales) y los sueros 13, 44 y 50 de un panel de sueros positivos al RNA de HCV.

La Fig. 6 es una gráfica que muestra la curva de diluciones estándar y el límite de detección de un sistema de ensayo en sándwich en el que un suero 50 estándar del panel, definido como de 1 U/ml, se diluyó de manera seriada y se sometió a un método de tratamiento de muestras, y después se midió usando un anticuerpo monoclonal de la presente invención.

La Fig. 7 es una gráfica que muestra la curva de diluciones estándar y el límite de detección de un sistema de ensayo en sándwich en el que un suero 50 estándar del panel, definido como de 1 U/ml, se diluyó de manera seriada y se sometió a un método de tratamiento de muestras, y después se midió.

La Fig. 8 muestra una actividad inmunológica del antígeno de la nucleocápsida en fracciones obtenidas mediante fraccionamiento en una columna de filtración en gel del suero 13 del panel que se había sometido al método de tratamiento de muestras. El peso molecular es de aproximadamente 150 kDa y de aproximadamente 68 kDa para la IgG y la albúmina respectivamente.

La Fig. 9 es una gráfica que muestra una correlación entre la actividad del antígeno de la nucleocápsida liberado y la cantidad de RNA de HCV determinada usando un *Amplifcore HCV Monitor* (método de PCR) de una muestra positiva en la PCR y que se había sometido a un método de tratamiento de muestras de la presente invención.

La Fig. 10 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración de cloruro de guanidina añadido sobre el tratamiento de muestras. Se usaron sueros procedentes de individuos humanos, normales y sanos (normales) y los sueros 13 y 50 de un panel positivo al RNA de HCV.

La Fig. 11 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración del Tritón X100 añadido sobre el tratamiento de las muestras. Se usaron sueros procedentes de individuos humanos, normales y sanos (normales) y los sueros 13 y 50 de un panel positivo al RNA de HCV.

La Fig. 12 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración del Tween 20 añadido sobre el tratamiento de las muestras. Se usaron sueros procedentes de individuos humanos, normales y sanos (normales) y los sueros 13 y 50 de un panel positivo al RNA de HCV.

La Fig. 13 es una gráfica que muestra el efecto de la temperatura durante el tratamiento de las muestras. Se usaron sueros procedentes de individuos humanos, normales y sanos (normales) y los sueros 13 y 50 de un panel positivo al RNA de HCV.

La Fig. 14 es una gráfica que muestra la curva de diluciones estándar y el límite de detección de un sistema de inmunoensayo en sándwich en el que un suero 50 estándar del panel, definido como de 1 U/ml, se diluyó de manera seriada y se sometió a un método de tratamiento de muestras, y después se midió.

La Fig. 15 muestra la actividad inmunológica del antígeno de la nucleocápsida en fracciones obtenidas mediante fraccionamiento con una columna de filtración en gel de suero 13 del panel que se había sometido a un método de tratamiento de muestras. El peso molecular es de aproximadamente 150 kDa y de aproximadamente 68 kDa para la IgG y la albúmina respectivamente.

La Fig. 16 es una gráfica que muestra una correlación entre la actividad del antígeno de nucleocápsida liberado y la cantidad de RNA de HCV determinada usando un *Amplifcore HCV Monitor* (método de PCR) de una muestra que se había sometido a un método de tratamiento de muestras de la presente invención y que había dado un resultado positivo con el *Amplifcore HCV Monitor* (método de PCR).

La Fig. 17 muestra una curva estándar obtenida mediante determinación de un antígeno recombinante de la nucleocápsida del virus de la hepatitis B (HBV), según la presente invención.

Mejor modo de realización de la invención

5

Los virus de los que trata la presente invención son virus que forman partículas víricas que tienen una estructura que comprende una proteína estructural que encapsula un RNA genómico o un DNA genómico y una proteína de membrana o una membrana lipídica que la rodea.

10 Ejemplos representativos de los virus anteriormente mencionados que contienen RNA como genoma incluyen el virus de la hepatitis C (HCV) y virus emparentados con el HCV.

Los virus emparentados con el HCV incluyen el virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis G, virus del exantema vírico de manos, pies y boca, flavivirus (virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo occidental, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue), togavirus (alfa-virus, rubivirus, arterivirus, virus de la rubeola), pestivirus (virus de la peste porcina, virus de la diarrea vírica bovina), paramixovirus (virus paragripal 1, 2, 3, 4, virus del moquillo canino, virus de la enfermedad de Newcastle), virus RS, virus de la peste bovina, virus paragripal del simio, virus del sarampión, virus de las paperas), ortomixovirus (virus de la gripe humana, virus de la gripe aviar, virus de la gripe equina, virus de la gripe porcina), rbdovirus (virus de la rabia, virus de la estomatitis vesicular), picornavirus (virus de la polio, virus de Coxsackie, virus ECHO, enterovirus de ganado bovino, enterovirus de ganado porcino, enterovirus del simio, virus de la encefalitis murina, rinovirus de seres humanos, rinovirus de ganado bovino, rinovirus de ganado equino, virus de la fiebre aftosa, virus de la hepatitis A), coronavirus (coronavirus de seres humanos, virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus de la hepatitis murina, virus de la gastroenteritis porcina transmisible), arenavirus (virus de la coriomeningitis linfocítica, virus de Lassa, virus de la fiebre hemorrágica de Corea), retrovirus (HTLV: virus de la leucemia de seres humanos adultos, HIV: virus del SIDA, virus de la leucemia y del sarcoma felino, virus de la leucemia bovina, virus del sarcoma de Rous), reovirus (rotavirus), calcivirus (virus de Norwalk), bunyavirus (virus de la fiebre hemorrágica con síndrome renal), filovirus (virus Ebola, virus de Marburg) y virus similares.

30 Ejemplos representativos de los virus anteriormente mencionados que contienen DNA como genoma incluyen el virus del hepatitis B (virus HBV) y virus emparentados con el HBV. Los virus emparentados con el HBV incluyen poxvirus [virus de la viruela vacuna (*vaccinia virus*), virus de la viruela menor (*alastrium virus*), virus de la viruela de la vaca (*cowpox virus*), virus de la viruela (*smallpox virus*)], parvovirus (parvovirus de seres humanos, parvovirus de ganado porcino, parvovirus de ganado bovino, parvovirus de origen canino, virus de la leucopenia felina, virus de la enfermedad del visón aleutiano), papovavirus (virus de papiloma, virus de polioma), adenovirus, virus de herpes (virus del herpes simple, citomegalovirus, virus del herpes zoster de la varicela, virus EB, virus del herpes equino, virus del herpes felino, virus de la enfermedad de Marek), virus del cólera porcino africano y virus similares.

Además de los anteriores, existen muchos virus patogénicos conocidos y existen muchos virus no identificados. Está claro que si esos virus tienen una estructura, anteriormente descrita, que comprende una proteína estructural que encapsula el RNA genómico o el DNA genómico y una proteína de membrana o una membrana lipídica que la rodea, pueden ser liberados en una forma adecuada para inmunoensayo usando el método de tratamiento de muestras de la presente invención.

45 A continuación se explicarán realizaciones para llevar a cabo la presente invención, haciendo referencia al HCV. Debido a que los niveles de HCV en sangre son desde 10^2 copias/ml hasta 10^6 copias/ml, que son inferiores a los de HBV (10^9 copias/ml), se requiere que un ensayo que detecte el antígeno vírico tenga una sensibilidad muy alta.

50 Generalmente, en un método de detección representado por un método inmunológico que usa un anticuerpo como sonda, los posibles métodos que aumentan la sensibilidad de la detección incluyen 1) un aumento en el número de las moléculas de antígeno que se han de detectar, 2) un aumento en el número de las moléculas de la sonda, por ejemplo un anticuerpo, que se une al antígeno, 3) una disminución en las reacciones inespecíficas que definen la sensibilidad de la detección, causadas por la unión de la sonda, por ejemplo un anticuerpo, con otra sustancia diferente del antígeno, y IV) un aumento en el límite de detección de un marcador de uso en la detección, y una combinación apropiada de estos métodos haría posible un aumento de la sensibilidad.

60 Como método para aumentar el número de moléculas de antígeno, I-1), un aumento en la cantidad de muestra es el más fácil de concebir. Pero, debido a que la cantidad máxima que se añade en un sistema de reacción comúnmente utilizado (por ejemplo, una inmunoplaqueta de 96 pocillos) no puede exceder de aproximadamente $300 \mu\text{l}$, I-1), se ha usado un método de concentración para aumentar el número de moléculas que se añaden al sistema de reacción.

65 Con el fin de aumentar el número de sondas, por ejemplo moléculas de anticuerpo que se une al antígeno, los medios más fáciles de concebir incluyen II-1) un aumento en el número de epítomos a reconocer usando múltiples sondas, por ejemplo anticuerpos, y II-2) un aumento en el número de anticuerpos unidos por unidad de tiempo, aumentando la afinidad (afinidad y avidéz) de la sonda, por ejemplo un anticuerpo, por el antígeno. Incidentalmente, los métodos posibles para aumentar la afinidad de, por ejemplo un anticuerpo, incluyen un método para cambiar la composición del tampón del sistema de reacción, un método para alterar la sonda, y un método que combina estos métodos anteriores. II-3) También se han concebido métodos en los que se capturan muchos antígenos uniendo un

ES 2 286 852 T3

gran número de anticuerpos a un soporte que tiene un área superficial amplia, tal como bolitas, partículas magnéticas, etc., para agrandar el área de reacción con una cantidad limitada de antígeno.

5 En el caso de enfermedades infecciosas, se espera que en la muestra se hallen anticuerpos humanos que posean una elevada afinidad de unión al antígeno. Por consiguiente, es de esperar que los epítomos de estos anticuerpos se superpongan con los epítomos de las sondas, por ejemplo anticuerpos, que se van a usar en la detección, originando como consecuencia una reacción competitiva que produce una disminución en el número de anticuerpos usados para la detección. Por lo tanto, se prevé que una disminución de estos anticuerpos interferentes en la muestra conduzca a un aumento en el número de moléculas de anticuerpo a usar en la detección, que se unen al antígeno (II-3).

10 Es efectivamente difícil generalizar los métodos para disminuir las reacciones inespecíficas, pero se han ideado estrategias que disminuyen las reacciones inespecíficas, como III-1) disminuir las reacciones inespecíficas aumentando la afinidad (afinidad y avidéz) de la sonda, por ejemplo un anticuerpo, por el antígeno, cambiando la composición de la disolución tampón, III-2) retirar el agente causante de la reacciones inespecíficas, y estrategias similares.

15 Los posibles métodos para aumentar la sensibilidad de la detección incluyen: IV-1) utilizar un marcador (un radioisótopo, etc.) con una elevada sensibilidad de detección; IV-2) amplificar las señales utilizando una enzima o un catalizador como marcador; IV-3) cambiar el sustrato de una enzima por otro que tenga una sensibilidad más alta; IV-4) amplificar las señales resultantes de una reacción enzimática o de una reacción química con medios eléctricos o mecánicos; IV-5) aumentar el número de marcadores por anticuerpo; IV-6) aumentar la sensibilidad del instrumento usado para la detección de las señales, y métodos similares.

20 Un análisis de las etapas de pretratamiento del método descrito para detectar el antígeno de la nucleocápsida del HCV reveló que el método comprende la etapa de concentrar el antígeno añadiendo polietilenglicol a la muestra, que a continuación se centrifuga para recuperar el HCV en forma de precipitado (I-2) y simultáneamente retirar parte de los componentes del suero (II-2), seguida de la etapa de resuspender el precipitado en una disolución que contiene urea y el agente alcalino para inactivar el anticuerpo humano presente en el suero, liberando de este modo el antígeno de la nucleocápsida del HCV (II-3), y de la etapa de añadir una disolución que contiene un tensioactivo no iónico (Tritón X100) y un agente neutralizante para preparar una disolución que se va a hacer reaccionar con el anticuerpo monoclonal.

25 Como se ha descrito en lo que antecede, la centrifugación y resuspensión del precipitado son etapas complicadas desde el punto de vista de procedimiento y requieren una gran habilidad. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es un sistema de detección de antígenos de la nucleocápsida que resuelva los anteriores problemas concernientes a los procedimientos.

30 La identidad del HCV propiamente dicho no ha sido dilucidada todavía. Pero sobre la base de su estructura genómica, de las estructuras de partículas víricas emparentadas y de la información general de la que se dispone sobre virus, se estima que una partícula de HCV contiene un RNA genómico que está empaquetado dentro de la nucleocápsida, que su vez está encapsulada por una proteína de cubierta que comprende los antígenos E1 y E2/NS1 que se encuentran anclados a una membrana lipídica que rodea el empaquetamiento anterior.

35 Es por lo tanto necesario retirar la cubierta para de este modo permitir la unión de una sonda, por ejemplo un anticuerpo, que se va a usar para detectar dicho antígeno de la nucleocápsida, con el fin de detectar el antígeno de la nucleocápsida. Además, se ha informado que la partícula vírica en la sangre toma la forma de una estructura de complejo en la que la partícula está rodeada por una LDL (del inglés, "*Low Density Lipoprotein*") (lipoproteína de baja densidad), etc., y ya que los anticuerpos dirigidos contra la proteína de la cubierta se hallan también presentes, se estima que la partícula vírica puede encontrarse en forma de inmunocomplejo con un anticuerpo anti-proteína de la cubierta. Así pues, con el fin de aumentar el número de moléculas de antígeno a detectar, es importante retirar eficientemente de la partícula vírica la cubierta y los contaminantes que rodean la partícula vírica, y liberar eficientemente las moléculas de antígeno de la nucleocápsida.

40 Esto mismo es válido para otros virus distintos del HCV y las proteínas estructurales de los virus deben ser liberadas eficientemente.

45 Así pues, la presente invención se refiere a un método de tratamiento, que pone a un antígeno vírico contenido en una muestra (suero) en un estado adecuado para su detección mediante el uso de una sonda, sin concentrar el antígeno utilizando un procedimiento complicado tal como una centrifugación.

50 Además, ya que se puede encontrar presente un anticuerpo humano, según se ha descrito en lo que antecede, con un título alto, y que compite con una sonda, por ejemplo un anticuerpo, por la unión, un procedimiento para separar dicho anticuerpo es importante para aumentar la sensibilidad.

55 Así pues, una de las realizaciones de la presente invención se refiere a un método de tratamiento que libera fácilmente antígenos víricos contenidos en una muestra, inactivando al mismo tiempo un anticuerpo humano que puede hallarse presente en la muestra.

ES 2 286 852 T3

Usando el método de tratamiento de la presente invención, los antígenos víricos contenidos en una muestra se liberan de una partícula vírica o de un inmunocomplejo en una forma adecuada para formar un inmunocomplejo con una sonda tal como un anticuerpo, e inactivando simultáneamente el anticuerpo humano presente en la muestra, que interfiere con la reacción de detección, se puede obtener fácilmente una detección muy sensible con un inmunoensayo que usa una sonda tal como un anticuerpo.

Según la primera realización (1) de la presente invención, una sonda tal como un anticuerpo que se va a usar en la detección, puede ser una sonda cualquiera siempre y cuando se una al antígeno vírico de una manera específica, presente ciertamente una alta afinidad y no induzca reacciones inespecíficas cuando se añade al sistema de reacción. Por ejemplo, en la detección de un antígeno de la nucleocápsida de HCV, según se describe en el Ejemplo 4, una de las sondas usadas en la reacción principal contiene preferiblemente una sonda que es capaz de reconocer y unirse al extremo C-terminal del antígeno de la nucleocápsida de HCV. Extremo C-terminal del antígeno de la nucleocápsida, según aquí se utiliza, significa una secuencia que va desde la posición 81 a la 160 de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 o una de sus partes. También puede contener una sonda específica para el extremo N-terminal del antígeno de la nucleocápsida de HCV. Extremo N-terminal del antígeno de la nucleocápsida, según aquí se utiliza, significa una secuencia que va desde la posición 10 a la 70 de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 o una de sus partes.

Según la segunda realización (2) de la presente invención, una sonda tal como un anticuerpo que se va a usar en la detección, puede ser una sonda cualquiera siempre y cuando se una al antígeno vírico de una manera específica, presente ciertamente una alta afinidad y no induzca reacciones inespecíficas cuando se añade al sistema de reacción. Por ejemplo, en la detección del antígeno de la nucleocápsida de HCV, una de las sondas usadas en la reacción principal contiene preferiblemente una sonda que es capaz de reconocer y unirse al extremo N-terminal del antígeno de la nucleocápsida de HCV. Extremo N-terminal del antígeno de la nucleocápsida, según aquí se utiliza, significa una secuencia que va desde la posición 10 a la 70 de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 o una de sus partes. También puede contener una sonda específica para el extremo C-terminal del antígeno de la nucleocápsida de HCV. Extremo C-terminal del antígeno de la nucleocápsida, según aquí se utiliza, significa una secuencia que va desde la posición 81 a la 160 de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 o una de sus partes.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, como sonda se puede usar una molécula que posea una especificidad y afinidad altas por el antígeno de la nucleocápsida, incluyendo: un anticuerpo monoclonal obtenido por inmunización de un animal experimental, tal como un ratón, conejo, pollo, cabra, oveja, animal bovino, etc., un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma obtenido mediante fusión de una célula de mieloma con un esplenocito aislado de un individuo inmunizado, un anticuerpo monoclonal producido por un esplenocito o un leucocito en una sangre inmortalizada por el virus EB y un anticuerpo producido por un ser humano o un chimpancé infectado con HCV; un anticuerpo recombinante producido por una célula transformada con un gen recombinante de un anticuerpo, generado combinando un fragmento génico de una región variable obtenida del cDNA o del DNA cromosómico de inmunoglobulina de ratón, seres humanos, etc., un fragmento génico de la región variable construida combinando una parte del cDNA o del DNA cromosómico de una inmunoglobulina con una secuencia construida artificialmente, un fragmento génico de la región variable construida usando una secuencia génica artificial, o un fragmento génico de la región variable construida mediante la tecnología de genes recombinantes usando los anteriores fragmentos como sillares, con un fragmento génico de la región constante de inmunoglobulinas; un anticuerpo fágico generado mediante la fusión de uno de los fragmentos génicos anteriormente descritos de la región variable con una proteína estructural de, por ejemplo un bacteriófago; un anticuerpo recombinante producido por una célula transformada con un gen recombinante de un anticuerpo, generado combinando uno de los fragmentos génicos anteriormente descritos de la región variable, con parte de otro fragmento génico adecuado, por ejemplo, el gen *myc*; una sonda producida introduciendo artificialmente una región variable en el gen de la tripsina, una sonda obtenida alterando artificialmente una molécula que se une específicamente a una proteína tal como un receptor, una sonda construida aplicando la tecnología de la química combinatoria y sondas similares.

La presente invención proporciona además la etapa de tratar una muestra con una disolución de tratamiento capaz de liberar un antígeno vírico desde una partícula vírica o desde un inmunocomplejo, y capaz de inactivar simultáneamente incluso un anticuerpo humano presente en la muestra que interfiera con la reacción de detección, con el fin de generar un estado adecuado para formar un inmunocomplejo constituido por el antígeno vírico anteriormente mencionado y una sonda específica para él, tal como un anticuerpo, en una muestra que contiene el antígeno vírico, y un método de ensayo y un kit analítico para detectar y cuantificar el antígeno de la nucleocápsida liberado, por medio de un inmunoensayo que usa una sonda tal como un anticuerpo.

Disolución para el tratamiento de muestras y método de tratamiento de muestras proporcionados por la presente invención

Las muestras, según aquí se usa su significado, incluyen fluidos biológicos tales como sangre completa, plasma, suero, orina, saliva, fluido cerebroespinal, tejido hepático y muestra similares.

Según la presente invención, el requerimiento más importante es un método de tratamiento de un antígeno vírico, tal como el antígeno de la nucleocápsida presente en una muestra, de manera que se genere un estado adecuado para que tenga lugar una reacción de unión con la sonda, tal como un anticuerpo monoclonal, sin el complicado procesamiento de una muestra. Así pues, con el fin de aumentar el número de moléculas de antígeno, es importante liberar eficientemente el antígeno vírico, tal como el antígeno de la nucleocápsida, contenido en una partícula vírica.

Como ya es sabido por lo que sucede en la electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecilsulfato sódico (SDS) (SDS-PAGE), muchas proteínas se desnaturalizan mediante un tratamiento con calor en presencia de SDS, y por ello moléculas diferentes de las unidas covalentemente son convertidas en monómeros. Por lo tanto, la adición de un agente de tratamiento que comprende un tensioactivo aniónico tal como SDS, produce la ruptura de los virus así como la
 5 desnaturalización de los anticuerpos dirigidos contra el antígeno vírico, tal como el antígeno de la nucleocápsida, presente en la muestra, haciendo posible la liberación del antígeno vírico, tal como el antígeno de la nucleocápsida, presente en la muestra. Esto fue también confirmado en el caso del antígeno de la nucleocápsida de HCV como se muestra el Ejemplo 7, es decir, cuando el antígeno de la nucleocápsida presente en una muestra infectada por HCV y tratada con un agente de tratamiento que contiene SDS, fue sometido a un análisis de fraccionamiento por pesos moleculares
 10 usando filtración en gel, se detectó en una posición que teóricamente se pronostica que es la posición del monómero.

Según lo publicado por Kashiwakuma y col., *J. Immunological Methods* 190:79-89, 1996, cuando el antígeno de la nucleocápsida aislado mediante SDS-PAGE a partir de una muestra que comprende un extracto de una célula con el antígeno HCV recombinante, se detecta usando un análisis de transferencia Western, su actividad inmunológica se detecta en una posición que se piensa que es la posición del monómero. Es fácil de entender por un experto en la técnica que la adición de un agente desnaturizante que comprende SDS a una muestra, produce la liberación eficiente de antígenos y un aumento en el número de moléculas de antígeno.
 15

Sin embargo, como es de sobra conocido, los tensioactivos aniónicos, tales como SDS, ejercen un efecto desnaturizante de proteínas muy fuerte, de manera que cuando se añaden a una reacción de formación de inmunocomplejos con el anticuerpo, desnaturalizan también el anticuerpo y con ello alteran su función dando lugar a la disminución en la sensibilidad. También es sabido que la estructura de los epítopos se destruye mediante tratamiento con un tensioactivo aniónico, causando una formación debilitada de enlaces con el anticuerpo y una sensibilidad disminuida. Con el fin de eliminar los factores responsables de la disminución de sensibilidad, el efecto desnaturizante que sigue al tratamiento
 20 con SDS necesita ser debilitado de una manera u otra.

Se sabe que los tensioactivos que comprenden tensioactivos aniónicos se pueden separar mediante medios tales como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, electroforesis, intercambio iónico, precipitación, transferencia a membranas, etc. El hecho de que, según se ha descrito en lo que antecede, se pueden detectar antígenos mediante un método de transferencia Western o un método de filtración en gel, indica que se puede efectuar una reacción de antígeno-anticuerpo usando un determinado procedimiento que sigue al tratamiento con SDS. Sin embargo, estos métodos requieren procedimientos largos y complejos, lo cual no es conveniente para los fines de la presente invención.
 30

Diluyendo con una cantidad en exceso de la disolución de reacción, es efectivamente posible disminuir el efecto desnaturizante hasta un nivel insignificante que no afecta a la reacción, pero este método no se puede aplicar a métodos tales como un inmunoensayo que conlleva el uso de pocillos de microtitulación en los que la cantidad de las muestras a añadir es limitado. En este sentido, es evidente que estos métodos no son adecuados para los fines de la presente invención.
 35

Así pues, los autores de la presente invención han investigado, en la primera realización de la presente invención, si la adición de un agente de tratamiento que comprende un tensioactivo aniónico y algún aditivo, pudiera disminuir el efecto desnaturizante producido por el tensioactivo aniónico hasta un nivel en el que la sonda, tal como un anticuerpo, no es afectada, y al mismo tiempo, aumentar el efecto de liberación de antígeno de la nucleocápsida producido por el tensioactivo aniónico.
 40

Los autores de la presente invención han encontrado que la adición de un agente de tratamiento que contiene un tensioactivo diferente de un tensioactivo aniónico tal como el SDS, debilita el efecto desnaturizante del SDS sobre el anticuerpo inmovilizado y, como resultado, puede aumentar la sensibilidad en comparación con la adición de un agente de tratamiento que contenga SDS solo. Los autores de la presente invención también han encontrado que cuando agentes que debilitan la formación de enlaces iónicos de hidrógeno, tales como un tensioactivo diferente de SDS y urea, se añaden al agente de tratamiento que contiene un tensioactivo aniónico tal como SDS, se observan efectos similares, y que la liberación de los antígenos de la nucleocápsida desde las partículas víricas y la inactivación del anticuerpo anti-antígeno de la nucleocápsida en la muestra se incrementan, con el resultado de que la liberación de los antígenos de la nucleocápsida aumenta más. Los autores de la presente invención también han encontrado que la detección del antígeno de la nucleocápsida con una sensibilidad más alta se obtiene realizando un tratamiento con calor después de la adición de un agente de tratamiento que contiene SDS y otros tensioactivos, y han completado la presente invención.
 45

Los tensioactivos aniónicos diferentes de SDS que se pueden usar en el tratamiento de las muestras, incluyen cetil-sulfato sódico u otros ésteres sulfato de alquilo, sulfonatos de alquilo tales como dodecilsulfonato sódico, sulfonatos de alquilo y alilo y tensioactivos similares. Los tensioactivos diferentes de los tensioactivos aniónicos que se pueden añadir incluyen tensioactivos anfóteros, por ejemplo, CHAPS (1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]), CHAPSO (2-hidroxi-1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]), dodecil-N-betaína, 1-propanosulfonato de 3-(dodecildimetilamonio); tensioactivos no iónicos, por ejemplo, polioxietilenoisooctilfenil-éteres tales como el Tritón X100, polioxietileno-nonilfenil-éteres tales como el NP 40, ésteres de polioxietileno-sorbitol tales como el Tween 80, polioxietilendodecil-éteres tales como Brij 58 y octilglucósido, siendo preferidos un tensioactivo anfótero como CHAPS y un tensioactivo no iónico como el Tritón X100. Es también ventajoso añadir un agente (desnaturizante de proteínas) que rompe estructuras superiores de proteínas, tales como urea, tiourea y agentes similares.
 60

ES 2 286 852 T3

Las concentraciones preferiblemente utilizadas en el tratamiento son: del 0,5% o superior para SDS; al 0,1% o superior para CHAPS; 1 M o superior para la urea; del 0,1% o superior y del 0,75% o inferior para el Tritón X100.

5 La temperatura usada en el tratamiento de las muestras puede ser cualquiera de las temperaturas comúnmente usadas en el laboratorio, es decir, entre 4°C y 100°C pero, cuando se añade un tensioactivo no iónico, se debe tener cuidado en su punto de enturbiamiento. Preferiblemente se utiliza una temperatura de 37°C o superior y el tratamiento a una temperatura de 50°C-60°C, que es la temperatura comúnmente utilizada para la inactivación del suero, es más efectivo.

10 *Eliminación de la interferencia producida por la hemoglobina*

Cuando se utiliza suero, etc. como muestra de la medición, los glóbulos rojos contenidos en dicha muestra experimentan hemólisis durante el pretratamiento anteriormente descrito y la hemoglobina se libera, y la hemoglobina desnaturalizada puede interferir en la medición uniéndose al antígeno vírico tal como el de la nucleocápsida de HCV. 15 Por lo tanto, en la primera realización de la presente invención, se prefiere eliminar esta interferencia en la medición capturando el grupo hemo de la hemoglobina. Como aditivo para este fin, los autores de la invención han encontrado que se prefiere la adición de al menos un compuesto de entre urea y un compuesto que contenga un anillo de imidazol.

20 Como compuestos que contienen el anillo de imidazol, se pueden mencionar imidazol, histidina, ácido imidazolacrílico, imidazolcarboxialdehído, imidazolcarboxamida, imidazoldiona, ácido imidazolditiocarboxílico, ácido imidazoldicarboxílico, imidazolmetanol, imidazolidinotona, imidazolidona, histamina, imidazopiridina y compuestos similares.

25 Como compuestos que contienen el anillo de indol, se pueden mencionar triptófano, ácido indolacrílico, indol, ácido indolacético, hidrazida indolacética, éster indolacético de metilo, ácido indolbutírico, indolacetónitrilo, indolcarbinol, indolcarboxialdehído, ácido indolcarboxílico, indoleanol, ácido indolacético, indolmetanol, ácido indolpropiónico, ácido indolpirúvico, indolilmetilcetona, indolmicina, indolacetona, indometacina, indoprofeno, indolamina y compuestos similares.

30 La cantidad añadida preferiblemente es desde 0,5 M hasta 5 M para la urea, desde 5 mM hasta 50 mM para el ácido indolacrílico y desde 0,05 M hasta 0,5 M para los demás aditivos.

35 Por otra parte, las proteínas de membrana tales como la proteína de la cubierta del HCV, no se disuelven espontáneamente a menos que se traten con este fin. Con el fin de disolver una proteína que contiene una porción hidrófoba, el método para convertir una porción hidrófoba en una porción hidrófila con un tensioactivo es muy conocido. Sin embargo, se sabe que determinadas sales tales como el cloruro de guanidina, poseen la propiedad de hacer solubles en agua a proteínas refractarias. Los iones producidos a partir de sales (agentes caotrópicos) que poseen esta propiedad se denominan iones caotrópicos, y como iones aniónicos se conocen los iones de guanidina, iones tiocianato, iones yodo, 40 iones peryodato, iones perclorato e iones similares. Se han usado sales que generan estos iones para hacer solubles a proteínas refractarias. Se estimó que los iones caotrópicos poseen una función de liberar eficientemente los antígenos desde las partículas víricas.

45 Cuando se añade un ion caotrópico, no obstante, la estructura secundaria de las proteínas se rompe provocando la destrucción de la estructura de los epítomos. Por lo tanto, cuando una sonda tal como un anticuerpo se añade para que tenga lugar la reacción de formación de inmunocomplejos en presencia de un ion caotrópico en el estado en que se encuentre, la unión con el anticuerpo se debilita y la sensibilidad disminuye, lo que se piensa que plantea un serio problema.

50 Por otra parte, el efecto desnaturalizante de los iones caotrópicos es en su mayor parte reversible, de manera que debilitando la fuerza iónica mediante diálisis o dilución, la estructura desnaturalizada temporalmente vuelve a su estructura original. Esto plantea otro problema asociado con el uso de un agente de tratamiento tal como un ion caotrópico. Es decir, conforme al método de tratamiento deseado de la presente invención, no solamente las partículas víricas presentes en la muestra son eficientemente liberadas, sino que el anticuerpo de alta afinidad que se une al antígeno presente en la muestra puede ser inactivado al mismo tiempo. Por lo tanto, la solubilización con un ion 55 caotrópico no proporciona una inactivación adecuada del anticuerpo de alta afinidad presente la muestra, y se cree que el anticuerpo afecta a la sensibilidad de manera adversa.

60 Así, los métodos de tratamiento que utilizan iones caotrópicos presentan dos problemas contrapuestos: en las condiciones en las que un ion caotrópico es capaz de destruir una estructura, las reacciones antígeno-anticuerpo se inhiben, y por otra parte el efecto de un ion caotrópico solo no es suficiente para inactivar los anticuerpos que interfieren con la reacciones que tienen lugar en la muestra, y en las condiciones en las que las reacciones entre antígeno-anticuerpo no están inhibidas, los anticuerpos contaminantes son capaces de inhibir esas reacciones.

65 Con el fin de solucionar estos problemas contrapuestos es necesario encontrar unas condiciones en las que los epítomos del antígeno se destruyan de manera reversible y las funciones de los anticuerpos contaminantes presentes en la muestra se destruyan de manera de irreversible.

Como condiciones en las que un anticuerpo es inactivado, se conocen el tratamiento con álcali, el tratamiento con ácido y tratamientos similares. El tratamiento de un suero con ácido puede producir resultados falsos positivos ya que el tratamiento desnaturaliza irreversiblemente parte de las proteínas del suero dando como resultado la formación de precipitados que en la mayoría de los casos impiden la medición con pipeta después del tratamiento de las muestras, y los precipitados que atrapan a las proteínas desnaturalizadas, son adsorbidos en la fase sólida en el momento de realizar la medición y debido a ello pueden ser detectados como una densidad. Además, se origina otro problema porque cuando el antígeno que interesa es atrapado de manera inespecífica en el precipitado, la cantidad de antígeno que reacciona con la sonda disminuye produciendo una disminución de la sensibilidad.

Los autores de la presente invención han encontrado que el tratamiento con ácido combinado con el tratamiento con guanidina resuelve los problemas asociados con el tratamiento con ácido, tales como la formación de precipitados y los problemas contrapuestos asociados con el tratamiento con guanidina, y de esta manera han completado la presente invención. Los autores de la presente invención también han encontrado que se prefiere aún más añadir un tensioactivo al agente de tratamiento que comprenden un ion caotrópico, tal como guanidina, y un agente acidificante. Como agente acidificante se prefieren ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido tricloroacético y ácidos similares.

Como tensioactivo, se prefiere un agente anfótero tal como CHAPS (1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]), CHAPSO (2-hidroxi-1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]), dodecil-N-betaína, 1-propanosulfonato de 3-(dodecildimetilamonio) o tensioactivos anfóteros similares, y un tensioactivo no iónico, por ejemplo, polioxietileno-octilfenil-éteres, por ejemplo Tritón X100; polioxietileno-nonilfenil-éter, por ejemplo NP40; éster de polioxietileno-sorbitol, por ejemplo Tween 20; polioxietileno-dodecil-éter, por ejemplo Brij 58; y octilglucósido o un tensioactivo no iónico similar. Además, a ello se puede añadir un agente tal como urea que destruye parcialmente una estructura superior de proteínas debilitando la formación de enlaces iónicos de hidrógeno.

En especial, se prefiere más usar hidrocloreuro de guanidina en concentración 2 M o mayor, Tritón X100 en concentración al 2% o mayor, y Tween 20 en concentración al 0,02% o mayor, a una temperatura de 4°C a 45°C.

En cualquiera de las realizaciones, es evidente que un antígeno vírico se puede liberar en forma de una sonda, es decir, en un estado adecuado para el denominado inmunoensayo que usa un anticuerpo como sonda, desde la muestra que contiene partículas víricas que poseen una estructura similar a la del HCV o HBV, usando el método de tratamiento de la presente invención. Virus que poseen una estructura similar a la del HCV o HBV, según aquí se usa la expresión, son virus que forman partículas víricas que tienen una estructura compuesta por proteínas que empaquetan el RNA genómico o el DNA genómico, y la proteína de membrana o la membrana lipídica que lo rodea. Estos virus incluyen, por ejemplo, flavivirus que están emparentados con el HCV, retrovirus tales como el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y virus similares. Además, los virus que tienen DNA como genoma, como el HBV, están también incluidos cuando tienen una estructura similar.

Exposición del antígeno vírico

Según la segunda realización de la presente invención que se refiere a un método para detectar el antígeno vírico en una muestra recogida durante el período ventana, el anticuerpo contra el antígeno vírico aún no se ha formado y por ello la rotura de la partícula vírica para exponer el antígeno vírico es suficiente y no es necesario destruir los anticuerpos presentes en la muestra. Por lo tanto, el pretratamiento de las muestras anteriormente descrito no es necesario y es suficiente la presencia de un agente que rompa la partícula vírica para exponer la partícula vírica. En especial, el agente que rompe la partícula vírica es esencial para los antígenos víricos presentes en la partícula vírica.

Se cree que las partículas víricas en general tienen una estructura en la que un ácido nucleico como genoma y un antígeno de la nucleocápsida forman un complejo que constituye una partícula y dicho partícula está revestida por una cubierta que comprende una membrana lipídica y una proteína de la envoltura. También se piensa que en la sangre las partículas víricas están presentes en forma de un complejo con una lipoproteína de baja densidad, un anticuerpo dirigido contra el virus y proteínas similares. Por ello, una sonda es incapaz de reconocer o de unirse a los antígenos víricos, específicamente, a los antígenos contenidos en la partícula vírica, cuando las partículas están en la forma en la que se encuentran en la sangre. Con el fin de detectar los antígenos víricos, por lo tanto, las partículas víricas deben ser tratadas, por ejemplo, retirando las estructuras que rodean a la partícula vírica de manera que la partícula vírica pueda ser reconocida por una sonda.

Así pues, la presente invención también proporciona condiciones de reacción con las que el antígeno vírico de la partícula vírica contenida en la muestra queda expuesto de manera que sea reconocido por la sonda encargada de reconocer la partícula vírica, un método para la reacción que comprende el sistema para llevar a cabo la reacción, y un reactivo que contiene el sistema para llevar a cabo la reacción.

Un sistema de reacción, adecuado para la detección de antígenos por el sistema proporcionado por la presente invención comprende unas condiciones que son lo suficientemente suaves para conservar la función del anticuerpo dirigido contra los epítomos del antígeno vírico, pero que son capaces de exponer en su totalidad la región reconocida por el anticuerpo, una sonda que reconoce el antígeno vírico, procedente de la partícula vírica que es una estructura complicada presente en la muestra.

En el caso del HCV, ya se ha demostrado que el antígeno de la nucleocápsida se puede detectar tratando las partículas víricas aisladas con ultracentrifugación (Takahashi y col., 1992, *J. Gen. Virol.* 73:667-672) y que las partículas de HCV se pueden precipitar mediante agregación con polietilenglicol usando un tensioactivo no iónico tal como Tween 80 o Tritón X100 (Kashiwakuma y col., *J. Immunological Methods* 190:79-89, 1996.). En el primer caso, no obstante, la sensibilidad de la detección no es lo suficientemente alta y queda la duda de si el antígeno ha quedado expuesto en su totalidad. En el segundo caso así mismo, el anticuerpo ha sido inactivado mediante la adición de otro agente de tratamiento, y no se hace mención al efecto de tensioactivo *per se*.

De acuerdo con la presente invención, las condiciones se estudiaron primero centrando la atención en el tensioactivo. De acuerdo con ello, se encontró que usando una composición basada en el tensioactivo, se obtuvo una detección eficiente del antígeno contenido en la partícula vírica, sin utilizar ningún procedimiento de pretratamiento tal como centrifugación o calentamiento, sino solamente diluyendo la muestra en la disolución de reacción.

Es necesario extraer eficazmente los antígenos víricos de las partículas víricas y suprimir las interacciones con varias de las sustancias presentes en el suero, para proporcionar con ello unas condiciones en las que la sonda puede reaccionar eficientemente con el antígeno. Como un tensioactivo efectivo usado en este caso, se puede mencionar un tensioactivo que contiene un radical alquilo de 10 o más carbonos y una amina secundaria, terciaria o cuaternaria en una única molécula, o un tensioactivo no iónico.

En el tensioactivo anteriormente mencionado que contiene un radical alquilo y una amina secundaria, terciaria o cuaternaria, el grupo alquilo es preferiblemente un grupo alquilo de cadena lineal y el número de átomos de carbono que hay en él es preferiblemente 10 o mayor, y más preferiblemente es de 10 a 20. Como amina, se prefiere una amina terciaria o cuaternaria (amonio). Los tensioactivos específicos incluyen ácido dodecil-N-sarcosínico, dodeciltrimetilamonio, cetiltrimetilamonio, 1-propanosulfonato de 3-(dodecildimetilamonio), 1-propanosulfonato de 3-(tetradecildimetilamonio), dodecilpiridinio, cetilpiridinio, decanoil-N-metilglucamida (MEGA-10), dodecil-N-betaína y tensioactivos similares. Se prefieren el ácido dodecil-N-sarcosínico y el dodeciltrimetilamonio.

Como el tensioactivo no iónico anteriormente mencionado, se prefieren los tensioactivos que tiene un equilibrio hidrófilo-lipófilo de 12 a 14 y se prefieren los polioxietilén-iso-octilfenil-éteres tales como Tritón X100 y Tritón X 114, o los polioxietilennonilfenil-éteres tales como Nonidet P40, Tritón N101 y Nikkol NP.

De acuerdo con la presente invención, los dos tipos anteriores de tensioactivos se pueden usar solos, pero es más preferible su uso combinado y se puede obtener un efecto sinérgico con el uso combinado.

Se pueden añadir componentes adicionales que cambian el entorno acuoso, tales como la urea.

Anticuerpo monoclonal utilizado como sonda en la presente invención

Fragmento génico de la proteína estructural de HCV, según aquí se utiliza, significa un fragmento génico que contiene la región de la nucleocápsida de la proteína estructural de HCV y un fragmento de DNA que tiene al menos una secuencia de bases que codifica un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos desde el 1 hasta el 160 del extremo N-terminal de HCV. De manera específica, es un fragmento génico que comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Polipéptido que tiene la actividad de antígeno de HCV, según aquí se utiliza, significa un polipéptido de fusión o un polipéptido que reacciona inmunológicamente con el anticuerpo anti-HCV, y se puede usar como antígeno para construir un hibridoma, y con un anticuerpo monoclonal de la presente invención, obtenido a partir del hibridoma. Específicamente, es un polipéptido con actividad de antígeno de HCV que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o un polipéptido con actividad de antígeno HCV que comprende una porción de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o un polipéptido que lleva una secuencia de aminoácidos adicional unida a su extremo N-terminal o a su extremo C-terminal.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención, dirigido contra el polipéptido de fusión anteriormente mencionado y contra el polipéptido que tiene las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 3 - 6, puede ser construido con facilidad por un experto en la técnica. La producción de un anticuerpo monoclonal por un hibridoma es muy conocida. Por ejemplo, se puede inmunizar periódicamente a ratones BALB/C por vía intraperitoneal o subcutánea, con un polipéptido de fusión o con el polipéptido anteriormente mencionado (en adelante nombrado como el antígeno en cuestión), como antígeno único o como antígeno mezclado con BSA, KLH o proteínas similares, él solo o en forma de una mezcla con un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund. Cuando el título de anticuerpo en el suero haya aumentado, el antígeno en cuestión se administra en la vena caudal como dosis de refuerzo. Una vez aislado el bazo asépticamente, se fusiona con una línea adecuada de células de mieloma para obtener un hibridoma. Este método se puede llevar a cabo según el método de Kohler y Milstein (*Nature* 256:495-497).

La línea de células de hibridoma obtenida mediante el método anterior se puede cultivar en un líquido de cultivo adecuado y las líneas de células de hibridoma que producen los anticuerpos que presentan reacciones específicas contra el antígeno en cuestión se seleccionan y se clonan. Para clonar los hibridomas productores de anticuerpos, se puede usar el método que utiliza agar blando (*Eur. J. Immunol.* 6:511-51-98, 1976) además del método de dilución límite. Los anticuerpos monoclonales así producidos se purifican mediante métodos tales como una cromatografía en columna usando proteína A.

ES 2 286 852 T3

Además de los anteriores anticuerpos monoclonales, se puede generar moléculas para usar como sonda. Por ejemplo, la generación de un anticuerpo recombinante se encuentra descrita con detalle en una revisión de Hoogenboon (*Trends in Biotechnology*, 15:62-70, 1997).

5 *Sistema de detección que usa una sonda*

Los anticuerpos monoclonales producidos según la presente invención se usan como reactivos de ensayo para detectar y cuantificar proteínas estructurales de HCV en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima, un enzimoimmunoensayo, un ensayo enzimático de inmunotransferencia de puntos, un radioinmunoensayo, un ensayo de agregación u otro de los inmunoensayos muy conocidos. Cuando para la detección se usan anticuerpos marcados, como compuestos marcados se pueden usar compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, enzimas, sustancias cromogénicas y compuestos similares.

Por ejemplo, cuando un método basado en un sistema de reacciones en sándwich se usa para detectar el antígeno vírico en una muestra (suero), el kit de diagnóstico que se ha de usar comprende uno o más anticuerpos monoclonales que revisten la superficie de un soporte sólido (por ejemplo, la pared interior de un pocillo de microtitulación), uno o más anticuerpos monoclonales o uno de sus fragmentos unidos a la sustancia marcada. Se puede usar cualquier combinación de un anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre un soporte sólido y de un anticuerpo monoclonal marcado, y se pueden seleccionar las combinaciones que proporcionen una sensibilidad alta.

Los soportes sólidos que se pueden usar incluyen, por ejemplo, placas de microtitulación, tubos de ensayo y capilares hechos de poliestireno, policarbonato, polipropileno, o bolitas de polivinilo (bolitas de látex, glóbulos rojos, compuestos metálicos, etc.), membranas (liposomas) etc., filtros y soportes similares.

25 **Efectos de la invención**

De acuerdo con el método de la presente invención, los antígenos víricos se pueden liberar cómodamente de la partícula vírica en un estado adecuado para un inmunoensayo que efectúa la detección usando un anticuerpo como sonda. Además, mediante el tratamiento de una muestra que contiene las partículas víricas, de acuerdo con la presente invención, se puede efectuar una detección y cuantificación fáciles y sensibles de antígenos víricos mediante un inmunoensayo en el que el antígeno se detecta usando un anticuerpo, etc., como sonda. También es posible producir un kit, un kit analítico y un reactivo de diagnóstico que determina la presencia o ausencia de los virus y que cuantifica los virus presentes en la muestra usando un inmunoensayo que emplea el método de tratamiento de muestras de la presente invención.

35 **Ejemplos**

Los Ejemplos que vienen a continuación ilustran la presente invención, pero no deben ser interpretados como limitativos del alcance de la presente invención.

40 **Ejemplo 1**

Expresión y purificación de un polipéptido derivado de HCV

45 **(A) Construcción de un plásmido de expresión**

Un plásmido correspondiente a la región de la nucleocápsida de HCV se construyó de la siguiente manera: un microgramo de cada uno de los DNA de los plásmidos pUC-C11-C21 y pUC-C10-E12, obtenidos integrando el clon C11-C21 y el clon C10-E12 (Publicación de Patente Japonesa no examinada (Kokai) Núm. 6 (1994)-38765) respectivamente en pUC119, se digirió en 20 μ l de una disolución de reacción para enzimas restricción [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, ditiotretitol 1 mM, NaCl 100 mM, 15 unidades de la enzima EcoRI y 15 unidades de la enzima ClaI] y de la disolución de reacción para enzimas de restricción [Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, ditiotretitol 1 mM, NaCl 50 mM, 15 unidades de la enzima ClaI y 15 unidades de la enzima KpnI] a 37°C, durante una hora cada reacción, y seguidamente se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para purificar aproximadamente 380 pb de un fragmento EcoRI-ClaI y aproximadamente 920 pb de un fragmento ClaI-KpnI.

A estos dos fragmentos de DNA y a un vector obtenido digiriendo pUC119 con EcoRI y KpnI, se añadieron 5 μ l de una disolución tampón 10X para ligasa [Tris-HCl 660 mM, pH 7,5, MgCl₂ 66 mM, ditiotretitol 100 mM, ATP 1 mM], 1 μ l de la ligasa de T4 (350 unidades/ μ l) y agua hasta completar un volumen total de 50 μ l, y después se incubaron a 16°C durante la noche para llevar a cabo una reacción de ligación. Usando este plásmido, se transformó la *E. coli* JM109 para obtener el plásmidos pUC-C21-E12.

Un nanogramo del DNA de este plásmido, pUC-C21-E12, se sometió a PCR usando dos cebadores: 5'-GAATT CATGGGCACGAATCCTAAA-3' (SEQ ID NO: 7) y 5'-TTAGTCCTCCAGAACCCGGAC-3' (SEQ ID NO: 8). La PCR se llevó a cabo usando el GeneAmp™ (DNA Amplification Reagent Kit, fabricado por Perkin Elmer Cetus) en condiciones de desnaturalización de DNA a 95°C durante 1,5 min, hibridación a 50°C durante 2 min y síntesis de DNA a 70°C durante 3 min. Los fragmentos de DNA así obtenidos se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se purificaron mediante el método que utiliza polvo de vidrio (*Gene Clean*).

ES 2 286 852 T3

Por otra parte, el pUC19 se digirió con SmaI y el fragmento de DNA obtenido por PCR se añadió a 5 μ l de una disolución tampón 10X para ligasa [Tris-HCl 660 mM, pH 7,5, MgCl₂ 66 mM, ditiotreitól 100 mM, ATP 1 mM], 1 μ l de la ligasa de T4 (350 unidades/ μ l) y agua hasta alcanzar un volumen total de 5 μ l, y después se incubaron a 16°C toda la noche para llevar a cabo una reacción de ligación. Usando este plásmido, se transformó la *E. coli* JM109 para obtener el plásmido pUC·C21-E12-SmaI. Un microgramo de este DNA plasmídico se digirió en 20 μ l de la disolución de reacción para enzimas de restricción [NaCl 150 mM, Tris-HCl 6 mM, pH 7,5, MgCl₂ 6 mM, 15 unidades de la enzima EcoRI y 15 unidades de la enzima BamHI] y seguidamente se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para separar aproximadamente 490 pb de un fragmento EcoRI-BamHI, que se purificó mediante el método que utiliza polvo de vidrio.

A continuación, 1 μ g del DNA del vector de expresión Trp-TrpE (Publicación de Patente Japonesa no examinada (Kokai) Núm. 5 (1993)-84085) se digirió en 20 μ l de la disolución de reacción para enzimas restricción [NaCl 150 mM, Tris-HCl 6 mM, pH 7,5, MgCl₂ 6 mM, 15 unidades de la enzima EcoRI y 15 unidades de la enzima BamHI] a 37°C durante 1 hora. A la mezcla de reacción se añadieron 39 μ l de agua y a continuación se calentó a 70°C durante 5 min. Seguidamente se añadió 1 μ l de una fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) (del inglés, "*Bacterial Alkaline Phosphatase*") y se hizo una incubación a 37°C durante 1 hora.

Se añadió fenol a la mezcla de reacción para realizar una extracción con fenol. La capa acuosa así obtenida se precipitó con etanol y el precipitado obtenido se secó. Un microgramo de DNA del vector obtenido, tratado con EcoRI-BamHI, y del anterior fragmento 140 de la nucleocápsida, se añadieron a 5 μ l de una disolución tampón 10X para ligasa [Tris-HCl 660 mM, pH 7,5, MgCl₂ 66 mM, ditiotreitól 100 mM, ATP 1 mM], 1 μ l de la ligasa de T4 (350 unidades/ μ l) y agua hasta completar un volumen total de 50 μ l, y se incubaron toda la noche a 16°C para llevar a cabo una reacción de ligación.

Usando 10 μ l de esta mezcla de reacción, se transformó la cepa HB101 de *E. coli*. Esta cepa sensible de *E. coli*, usada para la transformación, se puede construir mediante el método que usa cloruro cálcico [Mandel, M. y Higa A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159-162 (1970)]. La *E. coli* transformada se sembró en una placa de LB (triptófano al 1%, NaCl al 0,5%, agar al 1,5%) que contenía ampicilina en concentración de 25 μ g/ml, y se incubó toda la noche a 37°C. Usando un asa de siembra para inocular, un asa repleta loopful de la colonia bacteriana formada sobre la placa se transfirió a un medio de cultivo LB que contenía ampicilina en concentración de 25 μ g/ml y se incubó toda la noche a 37°C. Un volumen de 1,5 ml del cultivo bacteriano se centrifugó para recoger las células y a continuación el DNA plasmídico se sometió a una minipreparación utilizando el método que utiliza álcali [Manniaty y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982)].

Seguidamente, 1 μ g de DNA del DNA plasmídico así obtenido se digirió en 20 μ l de la disolución de reacción para enzimas restricción [NaCl 150 mM, Tris-HCl 6 mM, pH 7,5, MgCl₂ 6 mM, 15 unidades de la enzima EcoRI y 15 unidades de la enzima BamHI] a 37°C durante 1 hora y después se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se seleccionó el plásmido de expresión de Trp-TrpEcore160 que produjo aproximadamente 490 pb del fragmento EcoRI-BamHI.

(B) Expresión y purificación de un polipéptido codificado por el clon core 160

La cepa HB101 de *E. Coli* que contiene un plásmido de expresión Trp-TrpEcore160 se inóculo en 3 ml de medio 2YT (triptona al 1,6%, extractos de levadura al 1%, NaCl al 0,5%) que contenía una concentración de 50 μ g/ml de ampicilina y se cultivó a 37°C durante 9 horas. Un mililitro del cultivo se pasó a 100 ml de medio M9-CA (Na₂HPO₄ al 0,6%, KH₂PO₄ al 0,5%, NaCl al 0,5%, NH₄Cl al 0,1%, CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄ 2 mM, casaminoácidos al 0,5%, glucosa al 0,2%) que contenía una concentración de 50 μ g/ml de ampicilina y se cultivó a 37°C. Se añadió acrilato de indol hasta la alcanzar una concentración final de 40 mg/l a una OD600 = 0,3 y se cultivo durante más de 16 horas. El cultivo se centrifugó para recoger las células.

A las células se añadieron 20 ml de tampón A [Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 30 mM] para suspenderlas. La suspensión se centrifugó de nuevo para obtener 2,6 g de las células de expresión. Las células así obtenidas se suspendieron en 10 ml del tampón A. Después de romper la membrana de la *E. coli* con sonicación, la suspensión se centrifugó para obtener una fracción insoluble que contenía un polipéptido de fusión formado por un polipéptido codificado por el cDNA de HCV y TrpE. A esta fracción se añadieron 100 ml del tampón A que contenía urea 6 M para solubilizar y extraer el polipéptido de fusión. El extracto solubilizado se sometió a una cromatografía en columna de intercambio iónico usando *S-Sepharose* para purificar el polipéptido de fusión.

Ejemplo 2

Método para construir un hibridoma

El polipéptido de fusión (TrpC11) preparado mediante el método anteriormente descrito, se disolvió en urea 6 M y a continuación se diluyó en tampón de fosfato 10 mM, pH 7,3, que contenía NaCl 0,15 M hasta alcanzar una concentración final desde 0,2 mg/ml hasta 1,0 mg/ml, y se mezcló con una cantidad igual de adyuvante (Titermax) para formar una suspensión de TrpC11. Esta suspensión preparada con una concentración de TrpC11 desde 0,1 mg/ml hasta 0,5 mg/ml, se administró por vía intraperitoneal a ratones BALB/c de 4 a 6 semanas de edad. Una inmunización similar se llevó a cabo cada dos semanas y después de aproximadamente dos semanas más, se administraron 10 μ g de TrpC11 disuelto en disolución fisiológica salina, a través de la vena caudal.

ES 2 286 852 T3

Tres días después de la última inmunización de refuerzo, el bazo se aisló del animal inmunizado en condiciones asépticas y se cortó en trozos usando tijeras, trozos que después se desmenuzaron hasta obtener células individuales y se lavaron tres veces con medio RPMI-1640. Después de los lavados, una línea celular SP2/OAg14 de mieloma de ratón en fase de crecimiento logarítmica según se ha descrito en lo que antecede, $2,56 \times 10^7$ de dichas células, y $1,64 \times 10^8$ esplenocitos se mezclaron en un tubo de centrífuga de 50 ml. La mezcla se centrifugó a $200 \times g$ durante 5 min, se retiró el sobrenadante y al precipitado se añadió 1 ml de medio RPMI-1640 que contenía polietilenglicol (PEG) 4000 (fabricado por Merck) al 50%, y se añadieron 10 ml más de medio RPMI-1640 para llevar a cabo la fusión celular.

Una vez separado el PEG mediante centrifugación ($200 \times g$, 5 minutos), las células fusionadas se cultivaron en un medio RPMI 1640 que contenía suero bovino al 10%, hipoxantina, aminopterina y timidina (en adelante nombrado como medio HAT) en una placa de 96 pocillos, durante aproximadamente 10 días, para hacer crecer solamente los hibridomas. A continuación, los clones productores del anticuerpo de interés se detectaron mediante el método de ELISA, para obtener los hibridomas que producen el anticuerpo monoclonal de la presente invención que posee la especificidad de reacción deseada.

Los hibridomas así obtenidos se monoclonaron conforme al método convencional de dilución límite y los hibridomas obtenidos se denominaron HC11-11, HC11-14, HC11-10, HC11-3 y HC11-7. Estos cinco hibridomas se depositaron en el *National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology*, el 4 de julio de 1997, como FERM BP-6005, FERM BP-6006, FERM BP-6004, FERM BP-6002 y FERM BP-6003, respectivamente.

Ejemplo 3

Construcción de un anticuerpo monoclonal

Los hibridomas obtenidos con el método del Ejemplo 2 se inocularon en la cavidad abdominal de ratones tratados con pristano, etc., y se recogieron los anticuerpos monoclonales producidos en el fluido ascítico.

Los anticuerpos monoclonales se purificaron usando una columna de *Sepharose* unida a Proteína A para separar las fracciones que contenían IgG.

Por medio de un inmunoensayo en el que se usa un anticuerpo anti-isotipo Ig de ratón (fabricado por Zymed), se encontró que el isotipo de cada uno de los anticuerpos monoclonales C11-14, C11-11, C11-10, C11-7 y C11-3, producidos respectivamente a partir de los 5 hibridomas anteriormente mencionados, era IgG2 en el caso del C11-10 y C11-7; y era IgG1 en el caso de CH11-11, C11-14 y C11-3. Para los cinco anticuerpos monoclonales obtenidos, el análisis de epítomos se llevó a cabo usando los péptidos sintéticos compuestos por 20 aminoácidos sintetizados conforme a la secuencia derivada de la región de la nucleocápsida de HCV. El resultado indicó, como se muestra en la Tabla 1, que eran los anticuerpos monoclonales que reconocen de manera específica parte de la región de la nucleocápsida.

TABLA 1

Anticuerpo	Sitio de reconocimiento
C11-14	⁴¹ Gly- ⁵⁰ Arg (SEQ ID NO: 4)
C11-10	²¹ Asp- ⁴⁰ Gly (SEQ ID NO: 6)
C11-3	¹⁰⁰ Pro- ¹²⁰ Gly (SEQ ID NO: 5)
C11-7	¹¹¹ Asp- ¹³⁰ Phe (SEQ ID NO: 6)
C11-11	¹⁰⁰ Pro- ¹²⁰ Gly (SEQ ID NO: 5)

Ejemplo 4

Estudio sobre las condiciones de tratamiento de las muestras

1) *Concentración de SDS*

A $100 \mu\text{l}$ de un suero humano normal y de sueros positivos al RNA de HCV se añadieron $100 \mu\text{l}$ de la disolución de tratamiento que contenía concentraciones diferentes de SDS y CHAPS al 0,6%. Las mezclas se colocaron luego en un equipo de incubación a 56°C y se trataron durante 30 minutos, y $80 \mu\text{l}$ de cada una de las mezclas tratadas se usaron como muestra. El resultado obtenido usando el método de ensayo que se describe más adelante se muestra en la Fig. 1, tomando como abcisas la concentración de SDS en el momento de tratamiento.

ES 2 286 852 T3

2) Concentración de CHAPS

5 A 100 μ l de un suero humano normal y de sueros positivos al RNA de HCV se añadieron 100 μ l de la disolución de tratamiento que contenía concentraciones diferentes de CHAPS y SDS al 5%, las mezclas se colocaron en un equipo de incubación a 56°C y se trataron durante 30 minutos, y 80 μ l de cada una de las mezclas tratadas se usaron como muestra. El resultado obtenido usando el método de ensayo que se describe más adelante se muestra en la Fig. 2, tomando como abcisas la concentración de CHAPS en el momento de tratamiento.

3) Concentración de urea

10 A 100 μ l de un suero humano normal y de sueros positivos al RNA de HCV se añadieron 100 μ l de la disolución de tratamiento (SDS al 5% y CHAPS al 0,6%) que contenía concentraciones diferentes de urea. Las mezclas se colocaron después en un equipo de incubación a 56°C y se trataron durante 30 minutos, y 80 μ l de cada una de las mezclas tratadas se usaron como muestra. El resultado obtenido usando el método de ensayo que se describe más adelante se muestra en la Fig. 3, tomando como abcisas la concentración de urea en el momento de tratamiento.

4) Concentración de Tritón X100

20 A 100 μ l de un suero humano normal y de sueros positivos al RNA de HCV se añadieron 100 μ l de la disolución de tratamiento (SDS al 5%, CHAPS al 0,6%, urea 6 M) que contenía concentraciones diferentes de Tritón X100. Las mezclas se colocaron después en un equipo de incubación a 56°C y se trataron durante 30 minutos, y 80 μ l de cada una de las mezclas tratadas se usaron como muestra. El resultado obtenido usando el método de ensayo que se describe más adelante se muestra en la Fig. 4, tomando como abcisas la concentración de Tritón X100 en el momento de tratamiento.

5) Temperatura de reacción

25 A 100 μ l de un suero humano normal y de sueros positivos al RNA de HCV se añadieron 100 μ l de la disolución de tratamiento (SDS al 5%, CHAPS al 0,6%, urea 6 M, Tritón X100 al 0,75%). Las mezclas se trataron a 4°C, temperatura ambiente (23°C), 37°C, 45°C, 56°C y 70°C durante 30 minutos y 80 μ l de cada una de las mezclas tratadas se usaron como muestra. El resultado obtenido usando el método de ensayo que se describe más adelante se muestra en la Fig. 5.

Métodos de ensayo

35 Las muestras obtenidas en el estudio sobre las condiciones de tratamiento de los sueros se evaluaron individualmente usando los respectivos métodos de ensayo que se describen más adelante. Así, un anticuerpo monoclonal anti-antígeno de la nucleocápsida de HCV (una mezcla de cantidades iguales de los anticuerpos C11-3 y C11-7) se diluyó hasta una concentración total final de 6 μ g/ml en tampón de carbonato 0,1 M, pH 9,6, y 100 μ l de cada una de las diluciones se dispensaron en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (fabricada por Nunc). Después de que la placa se hubo incubado toda la noche a 4°C, se lavó dos veces con 0,35 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,3, que contenía ClNa 0,15 M. A continuación, se añadieron 0,35 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,35, que contenía caseína-Na al 0,5% (en adelante nombrada como disolución de bloqueo) y la placa se incubó de nuevo a temperatura ambiente durante 2 horas.

45 Después de que la disolución de bloqueo se hubo retirado, a los respectivos pocillos se añadieron 160 μ l de tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 7,3, que contenía NaCl 0,15 M, BSA al 1%, caseína-Na al 0,5% y Tween 20 al 0,05%, y las muestras a medir, obtenidas mediante aplicación del método de tratamiento de sueros, se añadieron a los respectivos pocillos. La placa se incubó luego a temperatura ambiente durante 2 horas, se lavó cinco veces con 300 μ l de la disolución de lavado. A continuación se añadieron 100 μ l de un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa (POD) (una mezcla de cantidades iguales de C11-10 y C11-14) y se hizo una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez finalizada la incubación, la placa se lavó cinco veces con 300 μ l de la anterior disolución de lavado. A la placa se añadieron 100 μ l de la disolución del sustrato (orto-fenileno-diamina, en adelante nombrado como OPD (del inglés, “*Ortho-Phenylene Diamine*”) y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguidos de la adición de 100 μ l de una disolución de ácido sulfúrico 2 N. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 492 nm (OD492) tomando como referencia la absorbancia a 630 nm.

55 Cada una de las condiciones de tratamiento se optimizó, según se muestra en las Figs. de 1 a 4. Fue difícil detectar el antígeno de la nucleocápsida en las muestras no tratadas, pero un tratamiento tan sencillo como éste hizo posible la detección del antígeno de la nucleocápsida. Especialmente, se demostró, que el antígeno de la nucleocápsida se puede detectar satisfactoriamente utilizando las condiciones de SDS al 0,5% o mayor, CHAPS al 0,1% o mayor, urea 1 M o mayor y Tritón X100 del 0,1% al 0,75%, y un intervalo de temperaturas de 4°C a 70°C.

Ejemplo 5

Método de detección y ensayo del antígeno de la nucleocápsida de la región estructural (1)

65 A 100 μ l de suero se añadieron 100 μ l de la disolución de tratamiento (SDS al 5%, CHAPS al 0,6%, urea 6 M, Tritón X100 al 0,75%). La mezcla después se colocó en un equipo de incubación a 56°C, se trató durante 30 minutos, y 120 μ l de la mezcla tratada se usaron como muestra.

ES 2 286 852 T3

Un anticuerpo monoclonal anti-antígeno de la nucleocápsida de HCV (una mezcla de cantidades iguales de C11-3 y C11-7) se diluyó hasta una concentración total final de 6 µg/ml en tampón de carbonato 0,1 M, pH 9,6, y 100 µl de cada una de las diluciones se dispensaron en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (fabricada por Nunc). Después de que la placa se hubo incubado toda la noche a 4°C, se lavó dos veces con 0,35 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,3, que contenía ClNa 0,15 M. A continuación, se añadieron 0,35 ml de la disolución de bloqueo y la placa se incubó de nuevo a temperatura ambiente durante 2 horas.

Después de que la disolución de bloqueo se hubo retirado, a los respectivos pocillos se añadieron 120 µl del tampón de reacción y de las muestras a medir, obtenidas con el método que tratamiento anterior, y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. La placa se lavó cinco veces con 300 µl de la disolución de lavado, y a continuación se añadieron a la placa 100 µl de un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa (POD) (una mezcla de cantidades iguales de C11-10 y C11-14) y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La placa se lavó cinco veces con 300 µl de la disolución de lavado y se añadieron 100 µl de la disolución del sustrato (POD), y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos, seguidos de la adición de 100 µl de una disolución de ácido sulfúrico 2 N. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 492 nm (OD492) tomando como referencia la absorbancia a 630 nm. Como suero estándar, el suero 50 del panel, definido como de 1 U/ml, se diluyó de manera seriada en tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,3, que contenía BSA al 1%, y que se trató y midió de manera similar.

La Fig. 6 muestra una línea de diluciones del suero 50 del panel, usado como suero estándar. El antígeno de la nucleocápsida presente en la muestra se determinó de una manera dependiente de la dosis y se pudo detectar hasta un nivel de aproximadamente 0,5 mU/ml. Se demostró por lo tanto que combinando un método muy sencillo de tratamiento de muestras y el anticuerpo monoclonal de la presente invención, el antígeno de la nucleocápsida del HCV se pueden detectar o cuantificar.

Ejemplo 6

Detección y cuantificación del antígeno de la nucleocápsida del HCV (2)

Método que usa un anticuerpo monoclonal marcado con fosfatasa alcalina

Se usaron una placa de microtitulación negra de 96 pocillos (Nunc) como soporte sólido, un anticuerpo monoclonal marcado con fosfatasa alcalina como anticuerpo marcado, y CDPstar (Emerald II como sensibilizador). Una línea de dilución del suero 50 del panel, usado como suero estándar, se muestra en la Fig. 7, en la que el antígeno de la nucleocápsida presente en la muestra se determinó de una manera dependiente de la dosis y se pudo detectar hasta un nivel de aproximadamente 0,5 mU/ml. Se demostró por lo tanto que el método que usa un anticuerpo monoclonal marcado con fosfatasa alcalina también es capaz de detectar o cuantificar el antígeno de la nucleocápsida del HCV.

Ejemplo 7

Estudio sobre aditivos para suprimir la disminución de sensibilidad en el suero hemolizado

Cuando se sometieron a ensayo componentes séricos con respecto a su efecto sobre la sensibilidad, se encontró que la adición de hemoglobina disminuía drásticamente la sensibilidad. Se pensó que la disminución estaba causada por el grupo hemo liberado por la hemoglobina desnaturalizada, producida por el pretratamiento que usa un agente de pretratamiento que contiene SDS, CHAPS o Tritón X100. Por lo tanto, se ensayaron aditivos que pudieran disminuir el efecto de la hemoglobina desnaturalizada añadiéndolos al agente de pretratamiento.

El efecto de la adición de urea se estudió añadiendo urea a las muestras modelo que se habían creado añadiendo una concentración alta de hemoglobina (fabricada por Kokusai Shiyaku: Kansho Check) a un suero positivo al antígeno de la nucleocápsida del HCV (suero Núm. 3 del panel) y determinando el antígeno de la nucleocápsida conforme al Ejemplo 6. El nivel de actividad del antígeno de la nucleocápsida en el grupo al que se había añadido hemoglobina en concentración de 430 mg/dl, con respecto al 100% del grupo al que no se había añadido hemoglobina, usado como control, se muestra en la Tabla 2. Se confirmó que cuando no se añade urea, el nivel de actividad del antígeno de la nucleocápsida en el grupo al que se ha añadido hemoglobina disminuía en el 30%, pero aumentando la cantidad de urea añadida, el nivel de actividad del antígeno de la nucleocápsida en el grupo al que se había añadido hemoglobina aumentaba, y la interferencia causada por la hemoglobina disminuía.

60

65

TABLA 2

Efecto supresor de la urea sobre la interferencia producida por la hemoglobina

Aditivo	% relativo con respecto al control
No adición	30,0
Urea 0,5 M	36,3
Urea 1 M	39,7
Urea 2 M	43,0
Urea 3 M	48,8
Urea 4 M	53,7

Por otra parte, debido que existe posibilidad de interacción de cada uno de los aminoácidos con el grupo hemo, y de un efecto de tamponamiento producido por el grupo amino y el grupo carboxilo, se añadieron diferentes aminoácidos y se estudió el grado de su efecto. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

El efecto supresor ejercido por diferentes aminoácidos sobre la interferencia producida por hemoglobina

Aditivo	% con respecto al control
No adición	22,7
histidina 0,1 M	53,7
triptófano 0,1 M	70,8
fenilalanina 0,1 M	45,8
leucina 0,1 M	25,9
glutamina 0,1 M	36,1
lisina 0,1 M	42,1
Arginina 0,1 M	31,4
ácido glutámico 0,1 M	49,8
glicina 0,1 M	39,1
prolina 0,1 M	31,2
serina 0,1 M	32,5

El triptófano y la histidina exhibieron el efecto supresor más potente sobre la interferencia. Se estudió la dependencia de la dosis del efecto supresor sobre esta interferencia y los resultados se muestran en la Tabla 4.

ES 2 286 852 T3

TABLA 4

Efecto supresor de la histidina y el triptófano sobre la interferencia producida por hemoglobina

5

10

15

20

25

Aditivo	% con respecto al control
No adición	24,2
Histidina 0,05 M	49,3
Histidina 0,1 M	59,8
Histidina 0,15 M	74,5
Histidina 0,2 M	77,0
triptófano 0,05 M	58,7
triptófano 0,1 M	71,5
triptófano 0,15 M	77,9
triptófano 0,2 M	89,0

30

Debido a que el grupo hemo está coordinado por una cadena lateral en la hemoglobina y retenido en la hemoglobina, se sugirió que el efecto era atribuible a la cadena lateral. Por consiguiente, se estudiaron el efecto del imidazol, cadena lateral de la histidina, y el efecto del ácido indolacrílico que contiene un anillo de indol, cadena lateral del triptófano, y los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Efecto supresor del imidazol y del ácido indol-acrílico sobre la interferencia producida por hemoglobina

35

40

45

50

55

Aditivo	% con respecto al control
No adición	22,1
Imidazol 0,05 M	35,2
Imidazol 0,1 M	42,0
Imidazol 0,15 M	58,8
Imidazol 0,2 M	70,7
Ácido indolacrílico 5 mM	50,4
Ácido indolacrílico 10 mM	69,0
Ácido indolacrílico 20 mM	90,3
Ácido indolacrílico 30 mM	96,8

60

Cuando a la reacción se añadió indol o ácido indolacrílico, se observó un efecto supresor de la interferencia producida por la hemoglobina, dependiente de la dosis, al igual que con la adición de los aminoácidos. Esto indicó que añadiendo a la reacción una sustancia que contiene un anillo de imidazol, por ejemplo histidina, o un anillo de indol, por ejemplo triptófano, se puede obtener la detección sensible del antígeno de la nucleocápsida incluso en el caso de muestras que contienen hemoglobina.

65

Se estudió el efecto de la combinación de los aditivos anteriores. El resultado se muestra en la Tabla 6. Mezclando histidina y triptófano se obtuvo una recuperación del 90% o mayor, y la adición de urea aumento aún más la sensibilidad de la detección.

TABLA 6

Aditivo	% con respecto al control
histidina 0,1 M/triptófano 0,1 M	91,1
urea 4 M/Tris 0,1 M/histidina 0,1 M	112,6

Ejemplo 8

Análisis de la forma molecular reconocida en el tratamiento de los sueros y en el método de ensayo

Se usó cada uno de los métodos de tratamiento de sueros para tratar 0,25 ml del suero 13 del panel. El suero tratado se sometió a fraccionamiento en una columna de filtración en gel (*Superdex* 200HR, 1 x 30) y se midió la actividad inmunológica anti-nucleocápsida presente en las fracciones. El resultado se muestra en la Tabla 8. La figura sugirió que las moléculas que poseen un peso molecular de aproximadamente de 20 kDa a 30 kDa están siendo reconocidas y que el antígeno de la nucleocápsida contenido en el virus ha sido liberado por la ruptura del virus y la inactivación del anticuerpo anti-nucleocápsida presente en el suero, por acción del pretratamiento anteriormente mencionado.

Ejemplo 9

Método de ensayo del antígeno de la nucleocápsida de la región estructural del HCV en suero

Los sueros en los que se había determinado que contenían de 10^3 a 10^7 copias/ml de RNA de HCV usando un kit *AmpliCore HCV Monitor kit* (Roche), que es un método de PCR, y sueros humanos normales, se usaron para cuantificar el antígeno de la nucleocápsida de HCV presente en los sueros, usando el método anteriormente descrito.

Como suero estándar, el suero 50 del panel (definido como de 1 U/ml) se diluyó de manera seriada en tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,3, que contenía BSA al 1%, y se trató de manera similar. Los resultados se muestran la Tabla 7. De las muestras ensayadas, el antígeno de la nucleocápsida en todos los sueros humanos normales se encontraba por debajo del límite de detección y se pudo detectar en todas las muestras que habían dado un resultado positivo en la PCR. La correlación se muestra la Fig. 9, que reveló que la correlación con el método de PCR era también alta, tanto como de 0,8 o mayor.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 286 852 T3

TABLA 7

Niveles de RNA de HCV y del antígeno de la nucleocápsida

Núm. de la muestra	RNA (K copias/ml)	Antígeno de la nucleocápsida (mU/ml)	
Suero humano normal	1	-	N.D.
	2	-	N.D.
	3	-	N.D.
	4	-	N.D.
	5	-	N.D.
Suero del panel	81	1,6	2,1
	80	8	2,1
	82	8	8,5
	33	16	3,7
	31	30	37,0
	26	87	266,7
	39	97	63,8
	41	170	116,1
	16	400	133,7
	50	1.000	1.000
	45	1.300	277,3
13	1.600	1.806	
N.D.: No detectado			

Ejemplo 10

Estudios sobre las condiciones de tratamiento de las muestras

1) *Concentración de hidrocloreuro de guanidina*

A 100 μ l de un suero humano normal y de sueros positivos al RNA de HCV se añadieron 100 μ l de la disolución de tratamiento que contenía concentraciones diferentes de hidrocloreuro de guanidina y HCl 0,5 N. Las mezclas se trataron a temperatura ambiente durante 30 minutos y 80 μ l de cada una de las mezclas tratadas se usaron como muestra. El resultado obtenido usando el método de ensayo que se describe más adelante se muestra en la Fig. 10, tomando como abscisas la concentración de hidrocloreuro de guanidina en el momento del tratamiento.

2) *Concentración de Tritón X100*

A 100 μ l de un suero humano normal y de sueros positivos al RNA de HCV se añadieron 100 μ l de la disolución de tratamiento que contenía concentraciones diferentes de Tritón X100 (hidrocloreuro de guanidina 6 M, HCl 0,5 N). Las mezclas se trataron a temperatura ambiente durante 30 minutos y 80 μ l de cada una de las mezclas tratadas se usaron como muestra. El resultado obtenido usando el método de ensayo que se describe más adelante se muestra en la Fig. 11, tomando como abscisas la concentración de Tritón X100 en el momento del tratamiento.

3) *Concentración de Tween 20*

A 100 μ l de un suero humano normal y de sueros positivos al RNA de HCV se añadieron 100 μ l de la disolución de tratamiento que contenía concentraciones diferentes de Tritón X100 (hidrocloreuro de guanidina 6 M, HCl 0,5 N,

ES 2 286 852 T3

Tritón X100 al 12,5%). Las mezclas se trataron a temperatura ambiente durante 30 minutos y 80 μ l de cada una de las mezclas tratadas se usaron como muestra. El resultado obtenido usando el método de ensayo que se describe más adelante se muestra en la Fig. 12, tomando como abcisas la concentración de Tween 20 en el momento del tratamiento.

5 4) *Temperatura de reacción*

A 100 μ l de un suero humano normal y de sueros positivos al RNA de HCV se añadieron 100 μ l de la disolución de tratamiento (hidrocloruro de guanidina 6 M, HCl 0,5 N, Tritón X100 al 12,5%, Tween 20 al 0,75%). Las mezclas se trataron a 4°C, temperatura ambiente (23°C), 37°C y 45°C durante 30 minutos, y 80 μ l de cada una de las mezclas tratadas se usaron como muestra. El resultado obtenido usando el método de ensayo que se describe más adelante se muestra en la Fig. 13.

Métodos de ensayo

15 Las muestras obtenidas en el estudio sobre las condiciones de tratamiento de los sueros se evaluaron individualmente usando los respectivos métodos de ensayo que se describen más adelante. Así, un anticuerpo monoclonal anti-antígeno de la nucleocápsida de HCV (una mezcla de cantidades iguales de los anticuerpos C11-14 y C11-11) se diluyó hasta una concentración total final de 6 μ g/ml en tampón de carbonato 0,1 M, pH 9,6, y 100 μ l de cada una de las diluciones se dispensaron en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (fabricada por Nunc). Después de que la placa se hubo incubado toda la noche a 4°C, se lavó dos veces con 0,35 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,3, que contenía ClNa 0,15 M. A continuación, se añadieron 0,35 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,35, que contenía caseína-Na al 0,5% (en adelante nombrada como disolución de bloqueo) y la placa se incubó de nuevo a temperatura ambiente durante 2 horas.

25 Después de que la disolución de bloqueo se hubo retirado, a los respectivos pocillos se añadieron 160 μ l de tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 7,3, que contenía NaCl 0,15 M, BSA al 1%, caseína-Na al 0,5%, Tween 20 al 0,05% y 20 μ l de Tris 1 M (en adelante nombrado como tampón de reacción) y las muestras a medir, obtenidas mediante el método de tratamiento de sueros anteriormente mencionado, se añadieron a los respectivos pocillos, se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se lavaron cinco veces con 300 μ l de la disolución de lavado y a continuación se añadieron 100 μ l de un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa (POD) (C11-10) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez finalizada la incubación, la placa se lavó cinco veces con 300 μ l de la anterior disolución de lavado. A la placa se añadieron 100 μ l de la disolución del sustrato (orto-fenilén-diamina, en adelante nombrado como OPD) y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguidos de la adición de 100 μ l de una disolución de ácido sulfúrico 2 N. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 492 nm (OD492) tomando como referencia la absorbancia a 630 nm.

Cada una de las condiciones de tratamiento se optimizó como se muestra en las Figs. de 10 a 13. El antígeno de la nucleocápsida fue difícil de detectar en las muestras no tratadas, pero un tratamiento tan sencillo como éste hizo posible la detección del antígeno de la nucleocápsida. En ninguno de los casos se observó incremento de las señales en individuos humanos sanos. También se demostró que el antígeno de la nucleocápsida se puede detectar satisfactoriamente empleando las condiciones de hidrocloruro de guanidina 2 M o mayor y Tritón X100 al 0,2% o mayor, y un intervalo de temperaturas de 4°C a 45°C.

Ejemplo 11

45 *Método de detección y ensayo del antígeno de la nucleocápsida*

A 100 μ l de suero se añadieron 100 μ l de la disolución de tratamiento (hidrocloruro de guanidina 6 M, HCl 0,5 N, Tritón X100 al 12,5%, Tween 20 al 0,75%). Se trató a temperatura ambiente durante 30 minutos y 120 μ l de la mezcla tratada se usaron como muestra.

55 Un anticuerpo monoclonal anti-antígeno de la nucleocápsida de HCV (una mezcla de cantidades iguales de C11-14 y C11-11) se diluyó hasta una concentración total final de 6 μ g/ml en tampón de carbonato 0,1 M, pH 9,6, y 100 μ l de cada una de las mezclas diluidas se dispensó en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (fabricada por Nunc).

60 Después de que la placa se hubo incubado toda la noche a 4°C, se lavó dos veces con 0,35 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,3, que contenía NaCl 0,15 M. A continuación, se añadieron 0,35 ml de la disolución de bloqueo y la placa se incubó de nuevo a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez se hubo retirado la disolución de bloqueo, a los respectivos pocillos se añadieron 150 μ l del tampón de reacción y de las muestras a medir, obtenidas según el método de tratamiento anterior, y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas.

65 La placa se lavó cinco veces con 300 μ l de la disolución de lavado, y a continuación se añadieron a la placa 100 μ l de un anticuerpo monoclonal (C11-10) marcado con peroxidasa (POD). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Seguidamente la placa se lavó cinco veces con 300 μ l de la disolución de lavado y se añadieron 100 μ l de la disolución del sustrato (OPD). Después de incubar la placa a temperatura ambiente durante 45 minutos, se añadieron 100 μ l de una disolución de ácido sulfúrico 2 N. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 492 nm (OD492) tomando como referencia la absorbancia a 630 nm. Como suero estándar, el suero 50 del panel, definido

ES 2 286 852 T3

como de 1 U/ml, se diluyó de manera seriada en tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,3, que contenía BSA al 1%, y se trató y midió de manera similar.

5 La Fig. 14 muestra una línea de diluciones del suero 50 del panel usado como suero estándar. El antígeno de la nucleocápsida presente en la muestra se determinó de una manera dependiente de la dosis y se pudo detectar a un nivel bajo de hasta aproximadamente 0,5 mU/ml. Se demostró por lo tanto, que combinando un método muy sencillo de tratamiento de muestras y el anticuerpo monoclonal de la presente invención, el antígeno de la nucleocápsida del HCV se pueden detectar o cuantificar.

10 Ejemplo 12

Análisis de la forma molecular reconocida en el tratamiento de los sueros y en el método de ensayo

15 Cada uno de los métodos de tratamiento de sueros se usó para tratar 0,25 ml del suero 13 del panel. El suero tratado se sometió a fraccionamiento en una columna de filtración en gel (*Superdex* 200HR, 1 x 30) y en las fracciones se midió la actividad inmunológica anti-nucleocápsida. El resultado se muestra en la Tabla 15. La figura sugirió que las moléculas que poseen un peso molecular de aproximadamente de 20 kDa a 30 kDa están siendo reconocidas y que el antígeno de la nucleocápsida contenido en el virus ha sido liberado de las distintas interacciones por la ruptura del virus y la inactivación del anticuerpo anti-nucleocápsida presente en el suero, por acción del pretratamiento anteriormente mencionado.

Ejemplo 13

Método de ensayo del antígeno de la nucleocápsida en suero

25 Los sueros en los que se había determinado que contenían de 10^3 a 10^7 copias/ml de RNA de HCV usando un kit *AmpliCore HCV Monitor kit* (Roche), que es un método de PCR, y sueros humanos normales, se usaron para cuantificar el antígeno de la nucleocápsida de HCV presente en los sueros, usando el método anteriormente descrito.

30 Como suero estándar, el suero 50 del panel (definido como de 1 U/ml) se diluyó de manera seriada en tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,3, que contenía BSA al 1%, y se trató de manera similar. Los resultados se muestran la Tabla 8. De las muestras ensayadas, el antígeno de la nucleocápsida presente en todos los sueros humanos normales, estuvo por debajo del límite de detección y se pudo detectar en todas las muestras que había dado un resultado positivo en la PCR. La correlación se muestra la Figura 16, que reveló que la correlación con el método de PCR era también alta, tanto como de 0,8 o mayor.

40 (Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 286 852 T3

TABLA 8

Niveles del RNA de HCV y del antígeno de la nucleocápsida

Núm. de la muestra	RNA (K copias/ml)	Antígeno de la nucleocápsida (mU/ml)	
Suero humano normal	1	-	N.D.
	2	-	N.D.
	3	-	N.D.
	4	-	N.D.
	5	-	N.D.
	6	-	N.D.
	7	-	N.D.
Suero del panel	1	50	166,4
	7	830	471,1
	8	26	61,5
	11	240	107,4
	13	1.600	1.426
	15	25	40,1
	16	400	240,3
	19	840	1.369
	26	87	1.093
	31	30	45,8
	33	16	58,5
	39	97	89,0
	41	170	43,9
	44	180	57,5
	49	33	47,7
50	1.000	1.005	
84	8,7	63,5	
N.D.: No detectado			

Ejemplo 14

Detección del antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis B (HBV)

Hasta aquí se ha explicado la detección del antígeno de la nucleocápsida de HCV. Los autores de la presente invención han investigado si este método de tratamiento es aplicable a la detección de proteínas estructurales de otros virus.

Un anticuerpo monoclonal (Tokushu Menneki Kenkyuusho [*Special Immunology Research Institute*]) contra el antígeno de la nucleocápsida de HBV se diluyó hasta alcanzar una concentración de 3 µg/ml en tampón de carbonato

ES 2 286 852 T3

0,1 M, pH 9,6, y se dispensó en forma de una parte alícuota de 100 μ l. Después de incubar toda la noche a 4°C, la placa se lavó con un tampón de fosfato y una parte alícuota de 350 μ l de una disolución de BSA al 1% se dispensó en la placa. Después de dejar reposar a temperatura ambiente durante 2 horas, la disolución de BSA al 1% se retiró por aspiración y se añadieron 200 μ l de la disolución de reacción.

5 Un antígeno recombinante de la nucleocápsida de HBV se usó como estándar y cinco sueros de pacientes que habían dado resultados positivos con respecto al antígeno HBe y resultados negativos con respecto al anticuerpo anti-HBe y diez sueros humanos normales se usaron como muestras. A 100 μ l de muestra, se añadieron 50 μ l de un reactivo de tratamiento (SDS al 7,5%, CHAPS al 0,75%, Tritón X100 al 0,15%, urea 2 M, histidina 0,1 M, triptófano 0,1 M) y
10 el tratamiento se realizó a 56°C durante 30 minutos. Después de tratamiento, se añadieron 50 μ l de la mezcla anterior a un pocillo relleno con la disolución de reacción y se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min.

Como comparación (en ausencia de tratamiento), 100 μ l de cada una de las muestras se diluyeron con 50 μ l de agua purificada y 50 μ l de la muestra diluida se usaron para la reacción. Después de lavar cinco veces con la disolución
15 de lavado, se añadió un anticuerpo monoclonal anti-nucleocápsida de HBV, marcado con biotina (una mezcla de cantidades iguales de Hbc-2, Hbc-5, Hbc-14) y se hizo una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de lavar cinco veces con la disolución de lavado, se añadió la fosfatasa alcalina marcada con avidina y la mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

20 Después de lavar cinco veces con la disolución de lavado, se añadió *CDPstar* (Emerald II como sensibilizador), se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se midió su quimioluminiscencia relativa. Una curva estándar de un antígeno recombinante de la nucleocápsida de HBV, diluido de manera seriada, se muestra en la Fig.
17, y la cantidad del antígeno de la nucleocápsida en las muestras medidas se muestra la Tabla 9. El límite de detección fue de 21 ng/ml. Cuando el valor de corte que distingue los sueros positivos al antígeno de la nucleocápsida de los
25 sueros negativos al antígeno de la nucleocápsida se definió en 60 ng/ml, los 10 sueros humanos normales, con o sin pretratamiento, dieron resultados negativos con respecto al antígeno de la nucleocápsida, y en los sueros de los pacientes con el virus de la hepatitis B, el antígeno de la nucleocápsida no se pudo ser detectar en el caso de ausencia de pretratamiento, pero con el pretratamiento, todos los sueros ensayados dieron resultados positivos con respecto al antígeno la nucleocápsida.

30 Se piensa que en los sueros de los pacientes con el virus de la hepatitis B, el pretratamiento rompió la partícula vírica e inactivó el anticuerpo anti-HBc, haciendo posible de este modo la detección del antígeno de la nucleocápsida. Por lo anteriormente expuesto, se confirmó que este método de tratamiento de muestras es útil para la detección de proteínas estructurales de virus diferentes del HCV, tales como el HBV, que tienen DNA en su genoma. No es
35 necesario decir que esto es válido en el caso de virus emparentados con el HCV tales como los flavivirus y retrovirus, por ejemplo HIV.

40 (Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

TABLA 9

Núm. de la muestra	no tratada		Pretratada	
	Ag de la nucleocápsida de HBV (ng/ml)	Evaluado	Ag de la Nucleocápsida de HBV (ng/ml)	Evaluado
Muestra humana normal				
1	<21	Neg.	<21	Neg.
2	<21	Neg.	<21	Neg.
3	<21	Neg.	<21	Neg.
4	<21	Neg.	<21	Neg.
5	<21	Neg.	46	Neg.
6	<21	Neg.	<21	Neg.
7	<21	Neg.	47	Neg.
8	<21	Neg.	<21	Neg.
9	<21	Neg.	26	Neg.
10	<21	Neg.	56	Neg.
Muestra HBV				
11	<21	Neg.	98	Pos.
15	<21	Neg.	94	Pos.
20	<21	Neg.	780	Pos.
21	<21	Neg.	270	Pos.
46	<21	Neg.	630	Pos.

Ejemplo 15

Método para una detección efectiva sin pretratamiento del antígeno

Las muestras que contenían partículas de HCV se diluyeron en una disolución de reacción a la que se había añadido un tensioactivo y se estudió la eficiencia de la detección del antígeno de HCV.

La detección del antígeno de la nucleocápsida de HCV se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático (EIA) (del inglés, "*Enzyme Immune Assay*") en sándwich usando un anticuerpo monoclonal contra el antígeno de la nucleocápsida de HCV. Entre los anticuerpos monoclonales obtenidos en el Ejemplo 3, C11-3 y C11-7 se usaron como el anticuerpo encargado de capturar el antígeno de la nucleocápsida, y C11-10 y C11-14 se usaron como el anticuerpo encargado de detectar el antígeno de la nucleocápsida capturado.

El EIA se llevó a cabo esencialmente usando las siguientes condiciones. Las disoluciones de los anticuerpos monoclonales C11-3 y C11-7, cada una de las cuales se había diluido hasta alcanzar una concentración de 4 µg/ml en tampón de acetato, se añadieron a una placa de microtitulación y se incubaron toda la noche a 4°C. Después de lavar con el tampón de fosfato, se añadió un tampón de fosfato que contenía BSA al 1% para efectuar el bloqueo. A la placa se añadieron 100 µl de la disolución de reacción y 100 µl de la muestra. La placa se agitó después y se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Las sustancias que no habían reaccionado se retiraron lavando con el tampón de fosfato al que se había añadido una concentración baja de un tensioactivo. A continuación se añadieron los anticuerpos monoclonales C11-10 y C11-14 marcados con fosfatasa alcalina y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez finalizada la reacción, las sustancias que no habían reaccionado se retiraron lavando con el tampón de fosfato al que se había añadido una concentración baja de un tensioactivo. A continuación se añadió una disolución del sustrato (*CDP-Star/Emerald 11*) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se midió la cantidad de luminiscencia.

ES 2 286 852 T3

A la reacción anterior se añadieron diferentes tensioactivos para estudiar sus efectos. Usando sueros positivos a HCV en los que el título de anticuerpo contra HCV está por debajo de límite de detección y virtualmente no contienen anticuerpo contra HCV, la actividad del antígeno de la nucleocápsida, basada en la cantidad de luminiscencia, se expresó en términos de un cociente de reacción en relación con la cantidad de luminiscencia del suero humano normal que se había definido como 1,0. Los resultados se muestran en las Tablas 10 y 11.

TABLA 10

Reactividad en relación con un suero humano normal (cociente S/N)

10

			NO 45	NO 46	NO 3	NO 7	NO 19	
	No adición		15,67	1,00	1,15	1,34	1,19	
15	Criterio de evaluación		>30,0	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0	
	Aditivo	HLB (%)						
20	Tensioactivo aniónico							
	dodecilsulfato sódico	40,0	0,5	5,42				
			2,0	5,73				
25	dodecil-N-sarcosinato sódico		0,5	12,79	2,70			
			2,0	125,43	7,27	3,83	3,70	
						6,71		
30	ácido perfluoroalquilcarboxílico S-113		0,5	10,55	1,27			
			2,0	6,72	0,91			
35	Tensioactivo catiónico							
	bromuro de cetilmetilamonio		0,5	72,97	7,42	3,09	3,52	
			2,0	44,55	5,35	3,09	3,52	
40	cloruro de dodecilpiridinio		0,5	53,43	4,70	2,05	1,52	
			2,0	12,44	2,49		2,33	
	n-dodeciltrimetilamonio		0,5	66,84	4,43	2,41	1,63	
			2,0	27,98	3,77		2,67	
45	bromuro de tetradecilamonio		0,05	14,69				
50	cloruro de n-octiltrimetilamonio		0,5	12,57		1,00	0,74	
			2,0	11,46			0,99	
	cloruro de n-deciltrimetilamonio		0,5	17,50		0,88	0,80	
			2,0	45,21		1,12	1,08	
55	Tensioactivo anfótero							
	CHAPS		0,5	29,57				
			2,0	25,32		1,63	1,82	
60	perfluoroalquilbetaína S-132		0,5	11,07	1,61			
	(procedente de ASAHI GLASS)		2,0	10,77	1,49			
65	ácido 3-(dodecildimetilamonio)-1-propanosulfónico		0,5	57,69				
			2,0	113,19		4,57	3,44	
						5,26		

ES 2 286 852 T3

TABLA 11

Reactividad en relación con un suero humano normal (cociente S/N)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

			NO 45	NO 46	NO 3	NO 7	NO 19
No adición			15,67	1,00	1,15	1,34	1,19
Criterio de evaluación			>30,0	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
Aditivo	HLB	(%)					
Tensioactivo no iónico							
MEGA-10	0,5	32,11	3,38				
	2,0	38,49	3,53	1,97	1,87	2,84	
Tween 20	16,7	0,5	16,88				
		2,0	12,36				
Tween 40	15,6	0,5	14,96		1,02	0,99	1,41
		2,0	19,10		1,33	1,25	1,64
Tween 80	15,0	0,5	12,45		1,33	1,23	1,10
		2,0	17,47				
Nonidet P-40	13,1	0,5	43,14		3,09	2,95	4,58
octil-glucósido	0,5	12,48		0,90	0,60	0,97	
		2,0	25,07		1,92	1,20	2,63
Tritón N101	13,4	0,5	26,50		1,85	1,62	2,70
		2,0	60,84		2,23	2,28	3,81
Tritón X100	13,5	0,5	22,72				
		2,0	71,08		2,90	2,34	3,86
Tritón X114	12,4	0,05	31,49		2,04	1,65	2,77
		2,0	58,62		1,92	2,11	2,51
Tritón X305	17,3	0,5	10,50		0,94	0,97	1,08
		2,0	25,91		1,30	1,24	1,87
Tritón X405	17,9	0,5	12,54		0,86	0,78	1,04
		2,0	24,92		1,21	1,24	1,25
Otros							
cloruro de bencildimetilamonio	0,5	5,45	1,00				
		2,0	7,01	1,12			
Trietilamina	0,5	3,89	0,97				
Mezcla de tensioactivos							
dodecil-N-sarcosinato sódico al 2% + Tritón X100 al 2%			244,13		6,11	5,50	12,71

ES 2 286 852 T3

Los resultados revelaron que la adición de un tensioactivo no iónico que posee un HLB de 12 a 14, representado por el Tritón X100, produce un incremento en la cantidad de luminiscencia aumentando de este modo la sensibilidad de la detección en sueros positivos al HCV, en comparación con los sueros humanos normales. También se aclaró, de manera similar y representado por el dodecil-N-sarcosinato sódico y el docediltrimetilamonio, que la adición de un tensioactivo que contiene en su estructura un grupo alquilo de cadena lineal que contiene al mismo tiempo 10 o más átomos de carbono y una amina secundaria, terciaria o cuaternaria, produce un aumento en la sensibilidad de la detección en sueros positivos al HCV. Este aumento en la sensibilidad no se observó con el tensioactivo anterior que tiene un grupo alquilo que contiene nada más que 8 carbonos (cloruro de n-octiltrimetilamonio). También se encontró que mezclando y añadiendo estos dos tensioactivos (en la Tabla 11, el dodecil-N-sarcosinato sódico al 2% y el Tritón X100 al 2% estaban mezclados), la sensibilidad de la detección en sueros positivos al HCV se puede aumentar aún más.

Ejemplo 16

15 *Detección del antígeno de la nucleocápsida en las muestras durante un período desde después de la infección por HCV hasta antes de la aparición del anticuerpo anti-HCV (período ventana)*

Con la adición de Tritón X100 al 2% y dodecil-sarcosinato sódico al 2% a la disolución de reacción principal, un panel PHV905 de seroconversión comercialmente disponible (*B.B.I. Inc.*) se midió conforme al Ejemplo 15. El panel PHV905 usado, se volvió positivo en el día 21 después del comienzo de la observación (suero Núm. PHV905-7) cuando se midió mediante el ensayo que usa el anticuerpo anti-HCV (*Ortho EIA 3.0*). En este ensayo, el título del anticuerpo se expresa en forma de un índice de corte (S/CO) que evalúa como positivo un valor de 1,0 o mayor. La actividad del antígeno de la nucleocápsida de HCV (cantidad de luminiscencia) se expresó en forma de la reactividad (S/N) en relación con la de un suero humano normal que se había definido como 1,0.

Como se muestra en la Fig. 12, la actividad del antígeno de la nucleocápsida se observa antes que el anticuerpo anti-HCV aparezca, la adición de un tensioactivo expuso el antígeno de la nucleocápsida de la partícula vírica, el cual reaccionó con el anticuerpo monoclonal inmovilizado, confirmando así la detección del antígeno de la nucleocápsida.

TABLA 12

Núm de suero	Días después del inicio de la Observación	Actividad del antígeno de la nucleocápsida de HCV (S/N)	Título del Ab anti-HCV (S/CO)
PHV905-1	0	5,32	0,000
905-2	4	8,30	0,000
905-3	7	15,63	0,000
905-4	11	4,37	0,300
905-5	14	14,75	0,700
905-6	18	7,57	0,700
905-7	21	4,82	2,500
905-8	25	3,31	5,000
905-9	28	1,61	5,000

60 Referencia a los microorganismos definidos en la Regla 13-2 de las Normas basadas en el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes

Nombre del depositario: *The National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology*

65 Dirección del depositario: *1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibalaki pref. Japón (Código postal 305).*

ES 2 286 852 T3

(1) Indicación del microorganismo: HC11-3

Fecha del depósito: 4 de Julio de 1997

5 Número del depósito: FERM BP-6002

(2) Indicación del microorganismo: HC11-7

10 Fecha del depósito: 4 de Julio de 1997

Número del depósito: FERM BP-6003

15 (3) Indicación del microorganismo: HC11-10

Fecha del depósito: 4 de Julio de 1997

20 Número del depósito: FERM BP-6004

(4) Indicación del microorganismo: HC11-11

25 Fecha del depósito: 4 de Julio de 1997

Número del depósito: FERM BP-6005

(5) Indicación del microorganismo: HC11-14

30 Fecha del depósito: 4 de Jjulio de 1997

Número del depósito: FERM BP-6006

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir un virus de la hepatitis C (HCV) o un virus de la hepatitis B (HBV) o un virus emparentado con HCV o HBV en una muestra, obteniendo una muestra adecuada para la detección del virus, que comprende la etapa de:

(1) tratar una muestra que contiene virus con una disolución de tratamiento que contiene (a) un tensioactivo aniónico y (b) al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un tensioactivo anfótero, un tensioactivo no iónico y un desnaturalizante de proteínas; de manera que la partícula vírica se rompe, el antígeno vírico queda expuesto o es liberado; y los anticuerpos contra el antígeno vírico, si están presentes en la muestra, son inactivados; y

(2) detectar el antígeno vírico mediante inmunoensayo.

2. Un método para medir un virus de la hepatitis C (HCV) o un virus de la hepatitis B (HBV) o un virus emparentado con HCV o HBV en una muestra, obteniendo una muestra adecuada para la detección del virus, que comprende la etapa de:

(1) tratar una muestra que contiene virus con una disolución de tratamiento que contiene (a) un tensioactivo aniónico, (b) un tensioactivo anfótero, (c) al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un tensioactivo no iónico y un desnaturalizante de proteínas; de manera que la partícula vírica se rompe, el antígeno vírico queda expuesto o es liberado; y los anticuerpos contra el antígeno vírico, si están presentes en la muestra, son inactivados; y

(2) detectar el antígeno vírico mediante inmunoensayo.

3. Un método para medir un virus de la hepatitis C (HCV) o un virus de la hepatitis B (HBV) o un virus emparentado con HCV o HBV en una muestra, obteniendo una muestra adecuada para la detección del virus, que comprende la etapa de:

(1) tratar una muestra que contiene virus con una disolución de tratamiento que contiene (a) un tensioactivo aniónico, (b) un tensioactivo anfótero, (c) un tensioactivo no iónico y (d) un desnaturalizante de proteínas; de manera que la partícula vírica se rompe, el antígeno vírico queda expuesto o es liberado; y los anticuerpos contra el antígeno vírico, si están presentes en la muestra, son inactivados; y

(2) detectar el antígeno vírico mediante inmunoensayo.

4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, en el que dicha disolución de tratamiento contiene además urea, un compuesto que contiene un anillo de imidazol o un compuesto que contiene un anillo de indol.

5. Un método según la reivindicación 4, en el que dicho compuesto que contiene un anillo de imidazol es imidazol, histidina, ácido imidazolacrílico, imidazolcarboxialdehído, imidazolcarboxamida, imidazoldiona, ácido imidazolditiocarboxílico, ácido imidazoldicarboxílico, imidazolmetanol, imidazolidinotona, imidazolidona, histamina o imidazopiridina.

6. Un método según la reivindicación 4, en el que dicho compuesto que contiene un anillo de indol es triptófano, ácido indolacrílico, indol, ácido indolacético, hidrazida indolacética, indolacetato de metilo, ácido indolbutírico, indolacetoneitrilo, indolcarbinol, indolcarboxialdehído, ácido indolcarboxílico, indoletanol, ácido indolacético, indolmetanol, ácido indolpropiónico, ácido indolpirúvico, indolilmetilcetona, indolmicina, indolacetona, indometacina, indoprofeno o indolamina.

7. Un método para medir un virus de la hepatitis C (HCV) o un virus de la hepatitis B (HBV) o un virus emparentado con HCV o HBV en una muestra, obteniendo una muestra adecuada para la detección del virus, que comprende la etapa de:

(1) tratar una muestra que contiene virus con una disolución de tratamiento que contiene (a) un ion caotrópico y (b) un agente acidificante; de manera que la partícula vírica se rompe, el antígeno vírico queda expuesto o es liberado; y los anticuerpos contra el antígeno vírico, si están presentes en la muestra, son inactivados; y

(2) detectar el antígeno vírico mediante inmunoensayo.

8. Un método para medir un virus de la hepatitis C (HCV) o un virus de la hepatitis B (HBV) o un virus emparentado con HCV o HBV en una muestra, obteniendo una muestra adecuada para la detección del virus, que comprende la etapa de:

(1) tratar una muestra que contiene virus con una disolución de tratamiento que contiene (a) un ion caotrópico, (b) un agente acidificante y (c) un tensioactivo no iónico; de manera que la partícula vírica se rompe, el antígeno

ES 2 286 852 T3

vírico queda expuesto o es liberado; y los anticuerpos contra el antígeno vírico, si están presentes en la muestra, son inactivados; y

(2) detectar el antígeno vírico mediante inmunoensayo.

5

9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8, en el que dicho inmunoensayo es un inmunoensayo que usa un anticuerpo monoclonal.

10

10. Un kit de diagnóstico para determinar la presencia o ausencia de un virus de la hepatitis C (HCV) o un virus de la hepatitis B (HBV) o un virus emparentado con HCV o HBV en una muestra, que es para uso en un método de inmunoensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, que comprende (1)(a) un tensioactivo aniónico y (b) al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un tensioactivo anfótero, un tensioactivo no iónico y un desnaturalizante de proteínas, o (2)(a) un agente caotrópico y (b) una agente acidificante y un tensioactivo no iónico.

15

11. Un kit de diagnóstico según la reivindicación 10, que incluye además urea, un compuesto que contiene un anillo de imidazol o un compuesto que contiene un anillo de indol.

20

12. Un kit de diagnóstico según la reivindicación 11, en el que dicho compuesto que contiene un anillo de imidazol es imidazol, histidina, ácido imidazolacrílico, imidazolcarboxialdehído, imidazolcarboxamida, imidazoldiona, ácido imidazolditiocarboxílico, ácido imidazoldicarboxílico, imidazolmetanol, imidazolidinotona, imidazolidona, histamina o imidazopiridina.

25

13. Un kit de diagnóstico según la reivindicación 11, en el que dicho compuesto que contiene un anillo de indol es triptófano, ácido indolacrílico, indol, ácido indolacético, hidrazida indolacética, indolacetato de metilo, ácido indolbutírico, indolacetonitrilo, indolcarbinol, indolcarboxaldehído, ácido indolcarboxílico, indoletanol, ácido indolacético, indolmetanol, ácido indolpropiónico, ácido indolpirúvico, indolilmetilcetona, indomicina, indolacetona, indometacina, indoprofeno o indolamina.

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

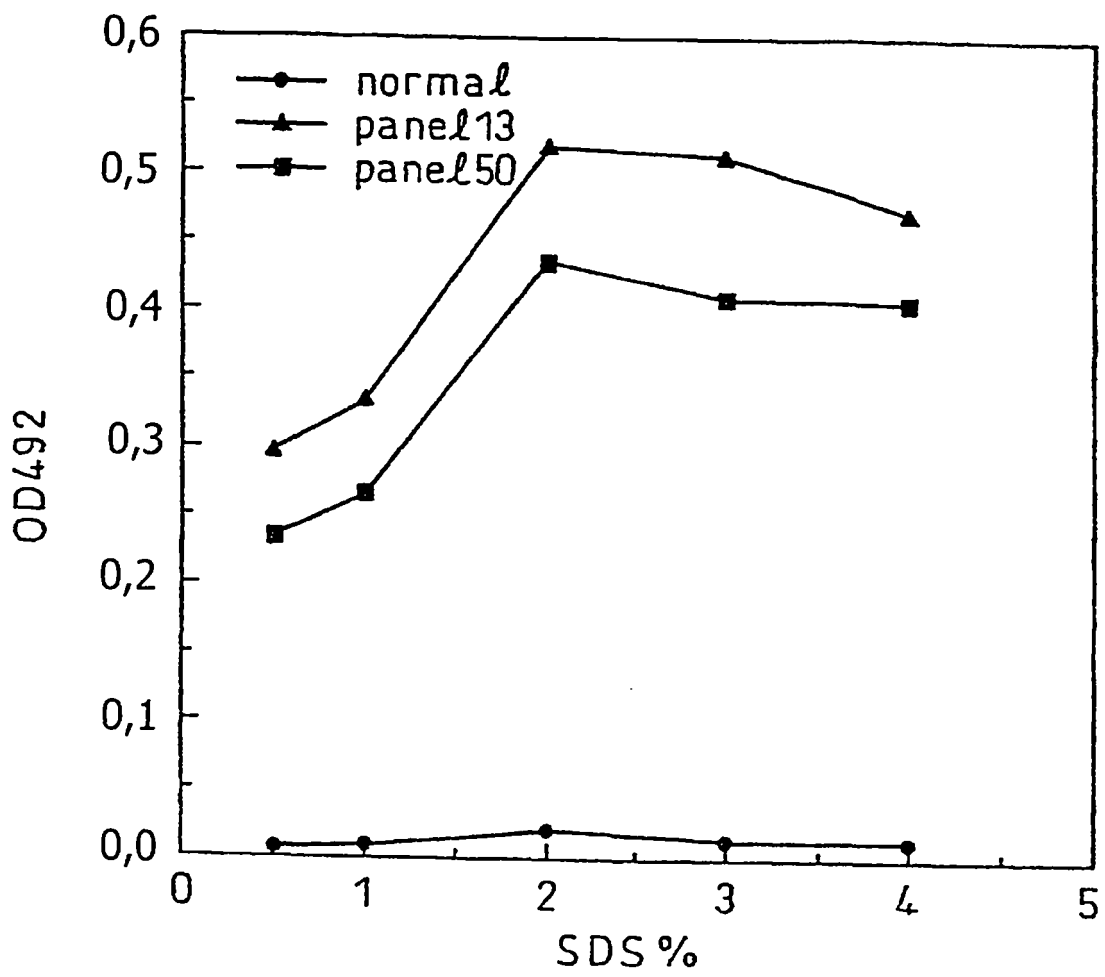


Fig. 2

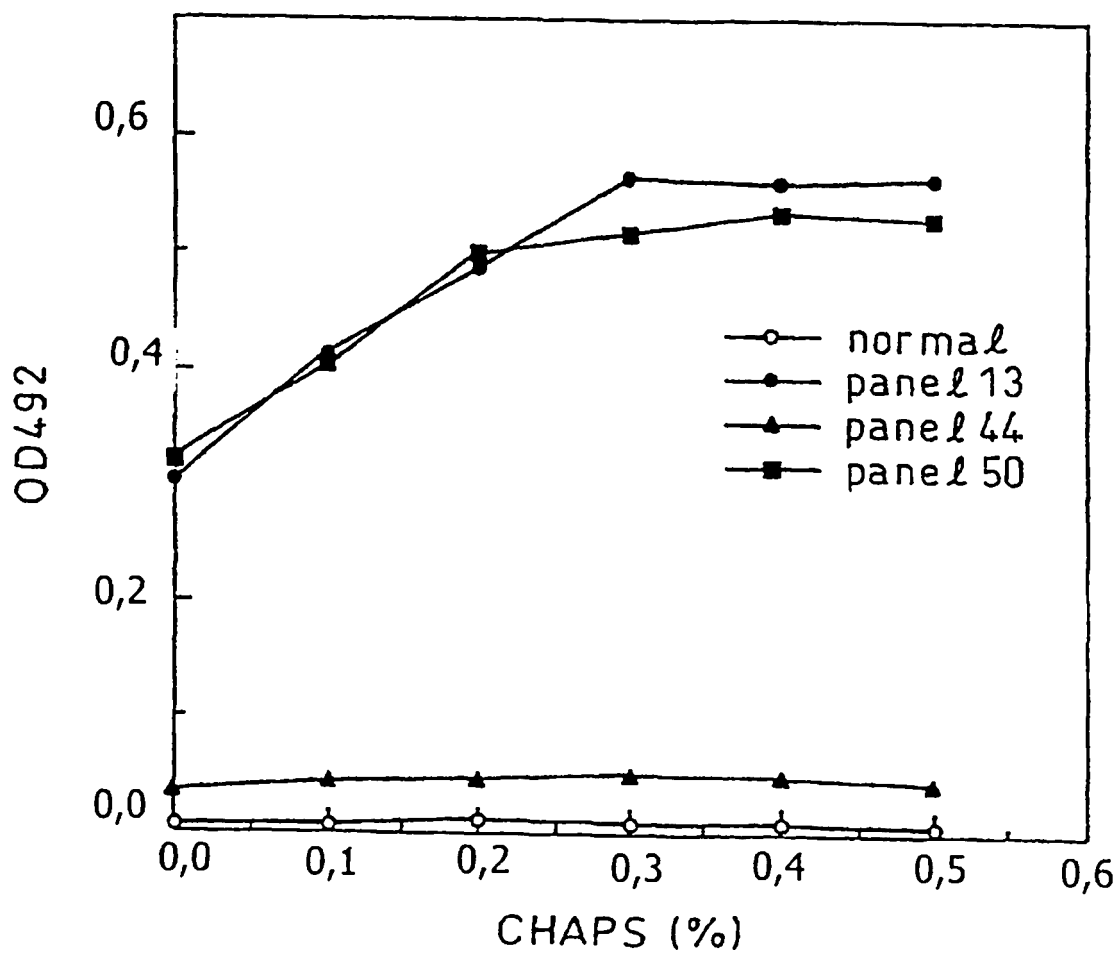


Fig.3

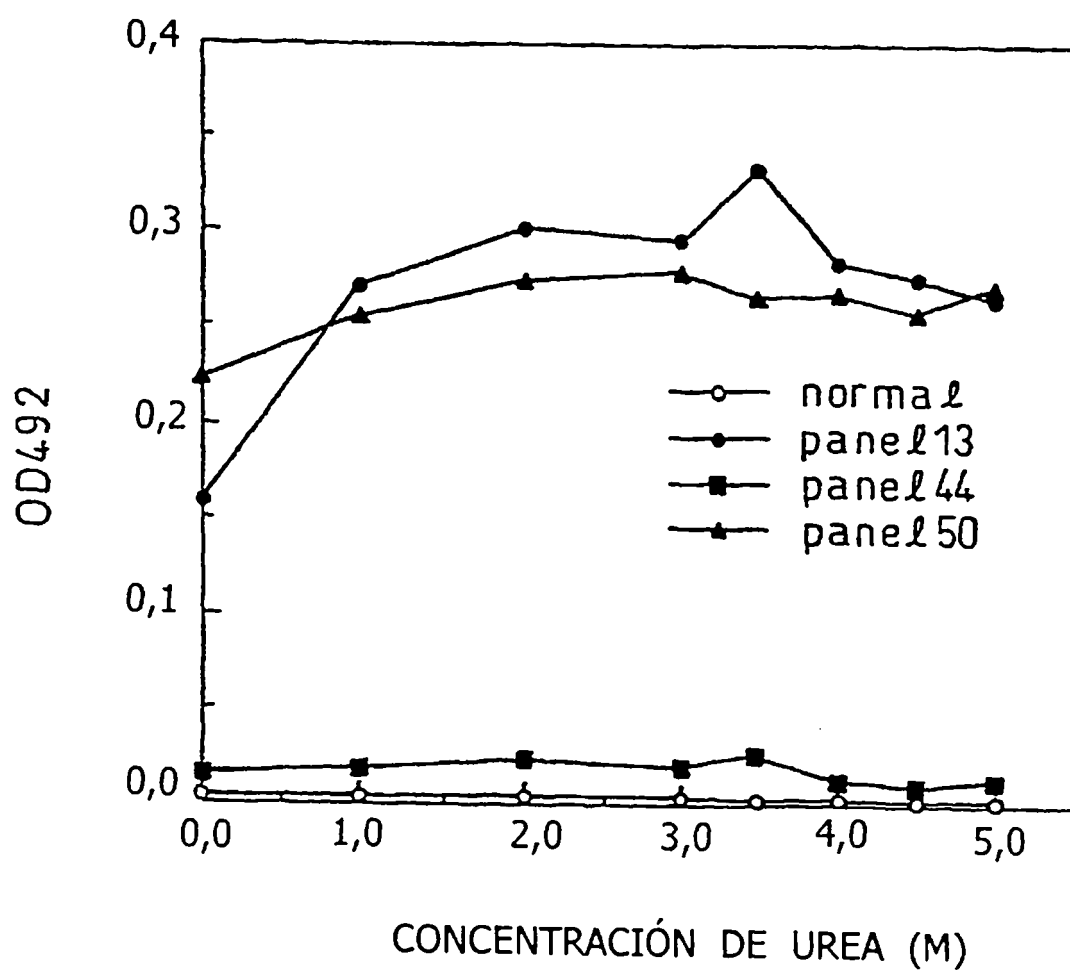


Fig. 4

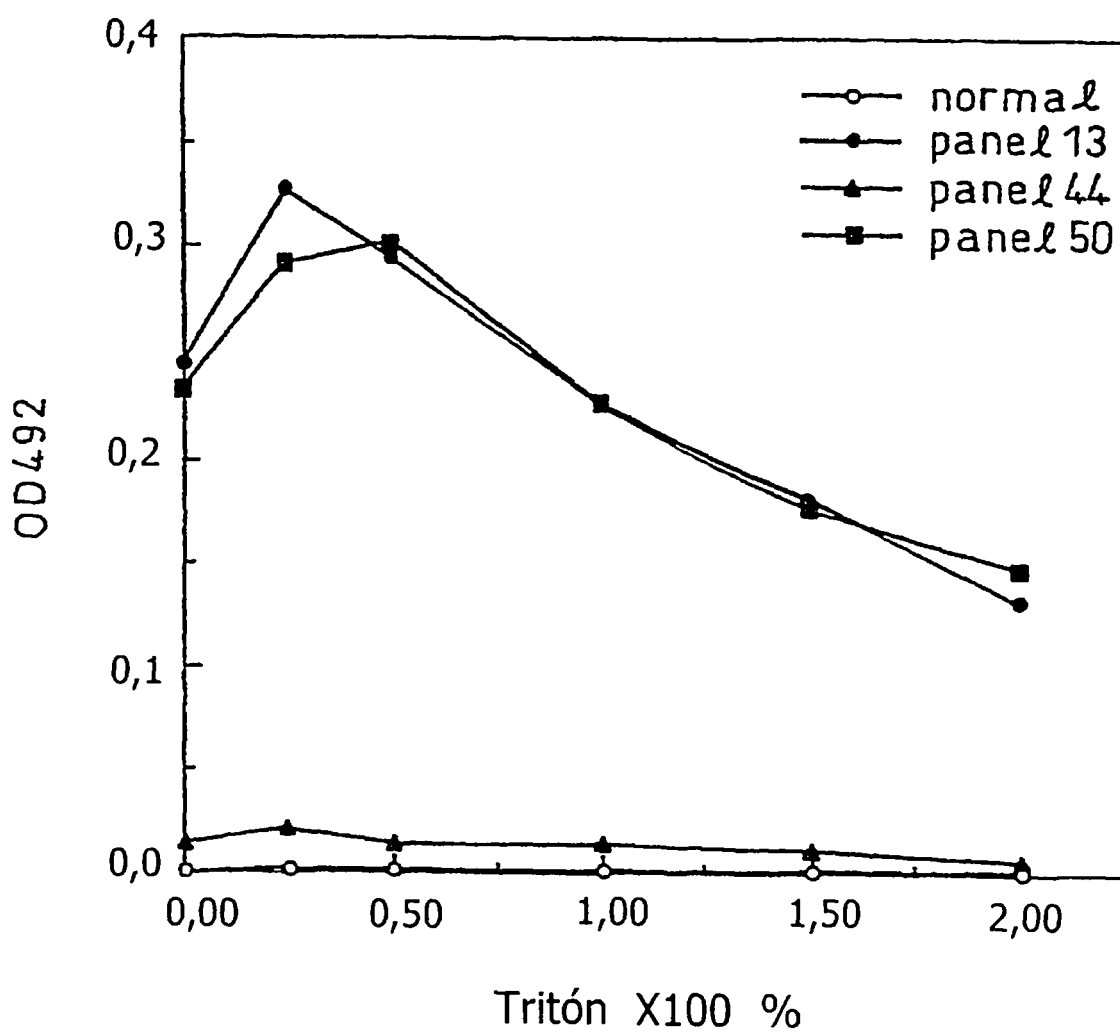


Fig.5

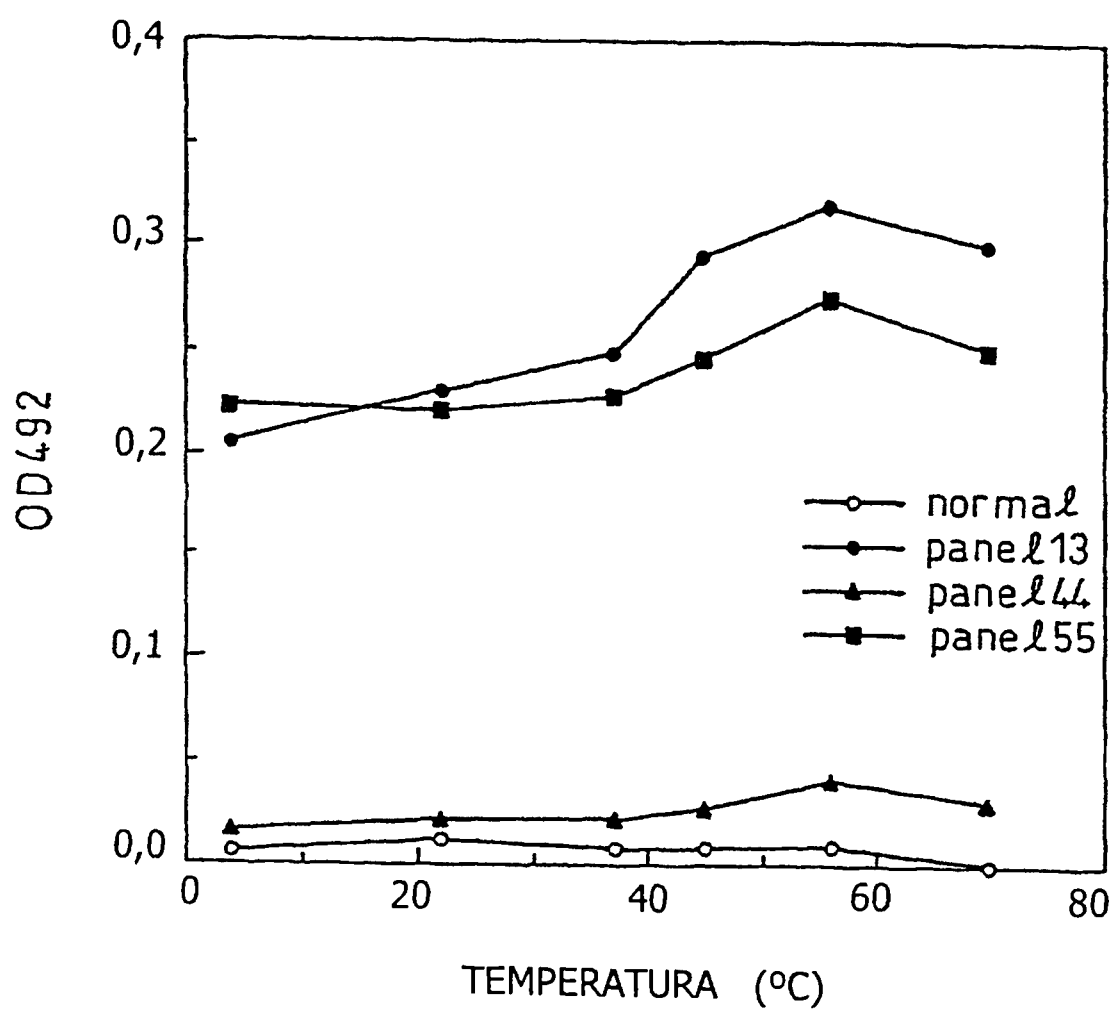


Fig.6

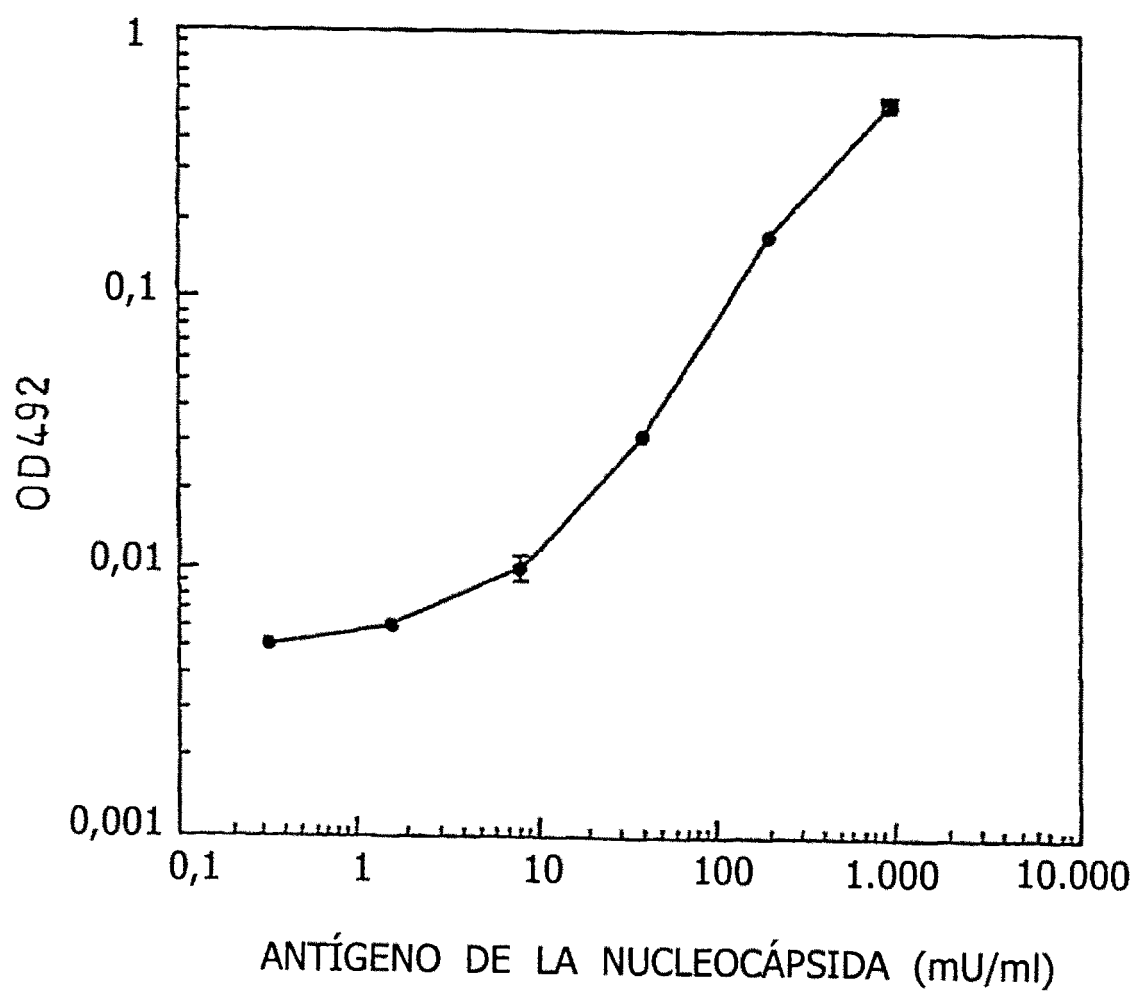


Fig.7

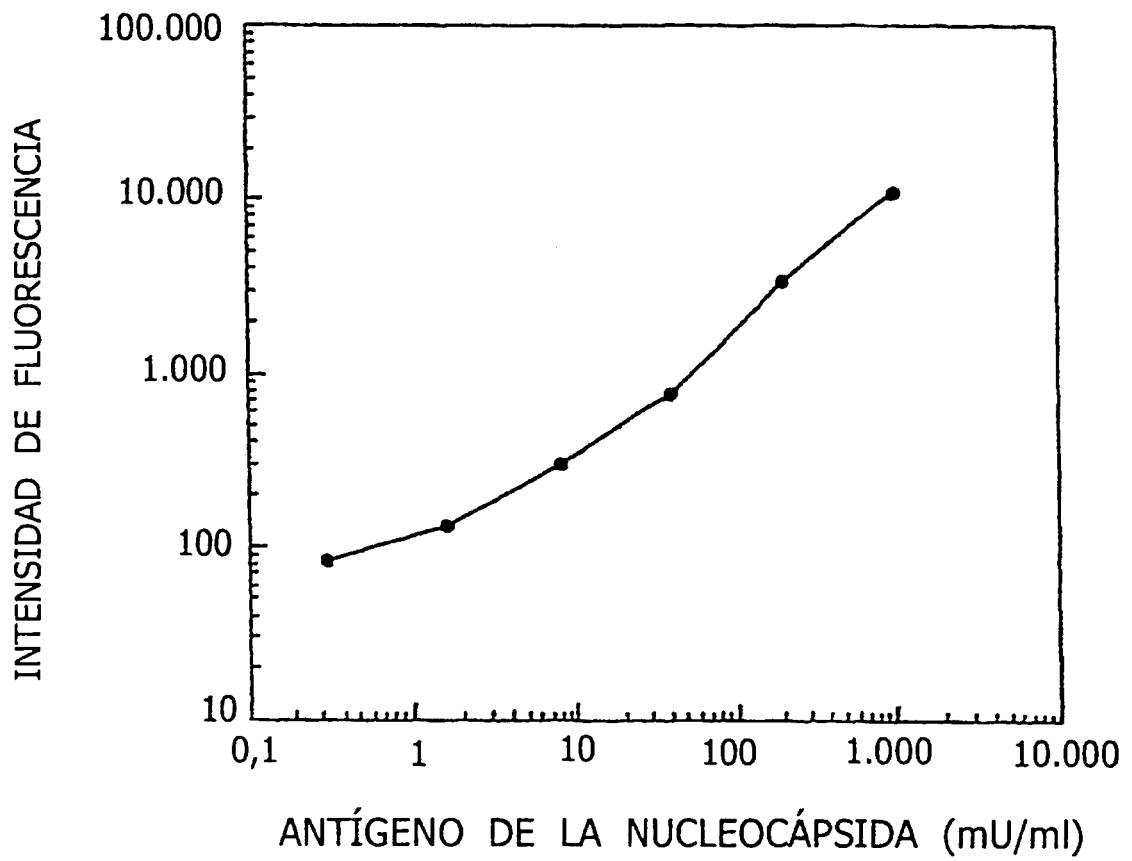


Fig. 8

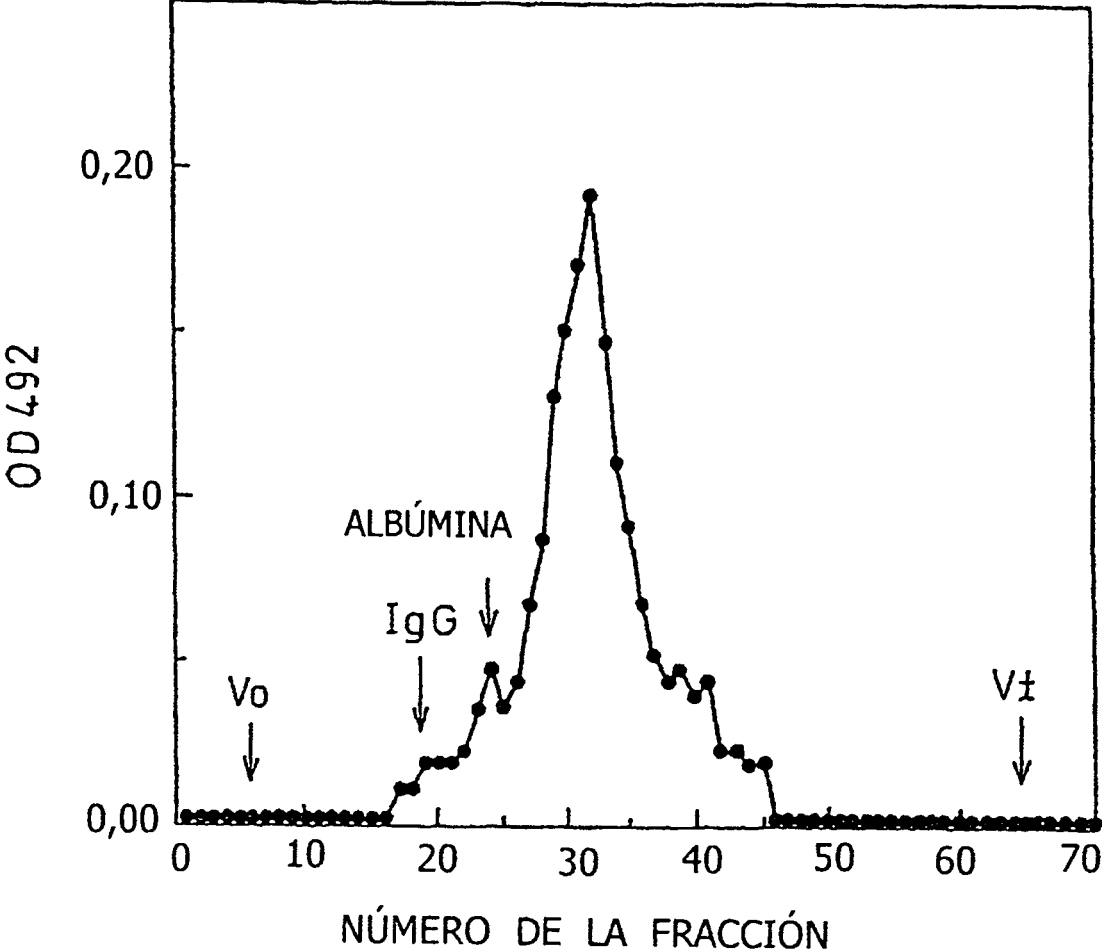


Fig.9

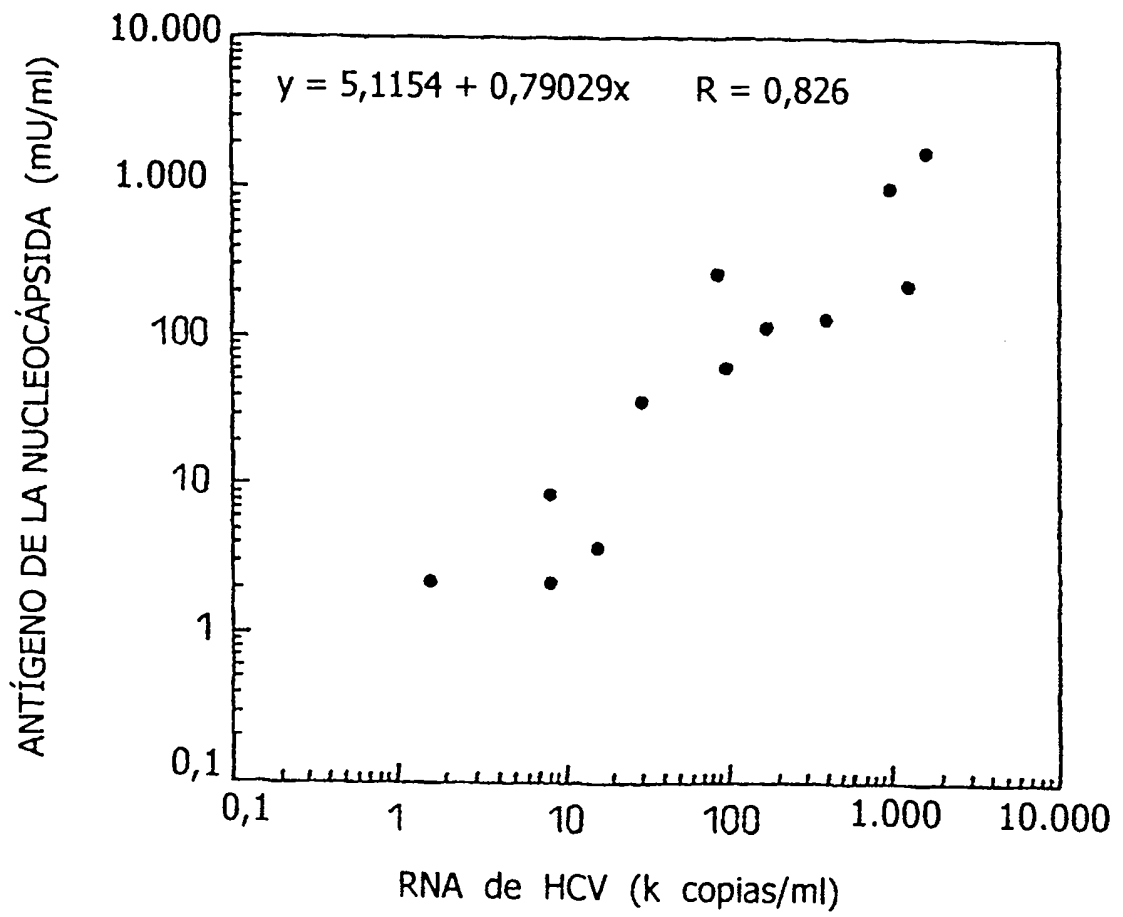


Fig.10

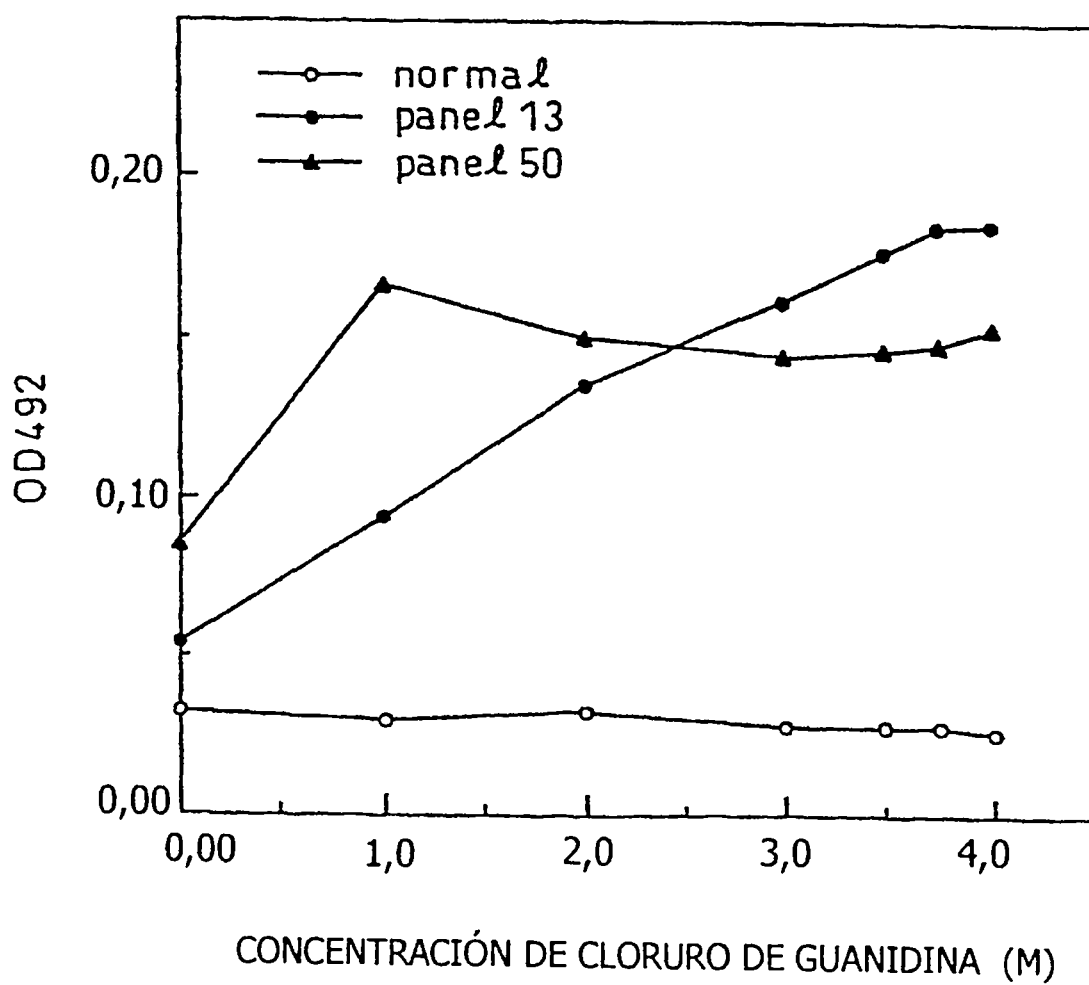


Fig.11

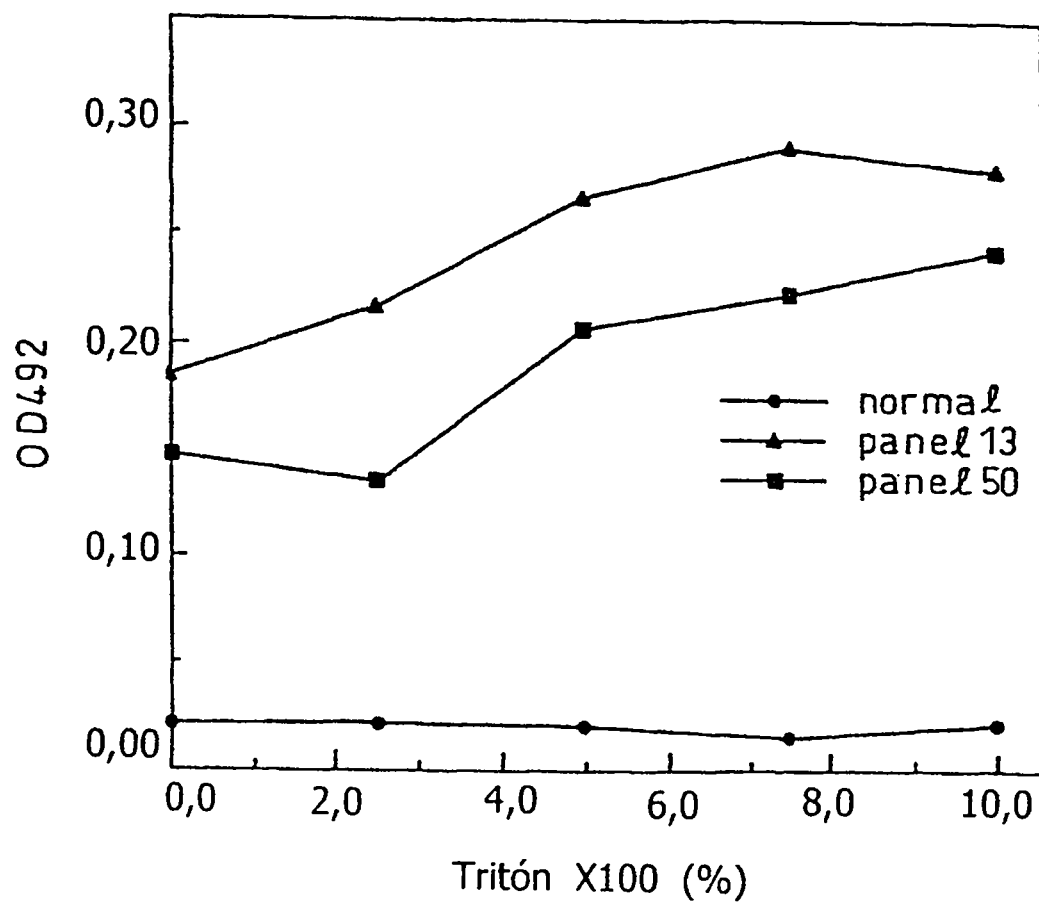


Fig.12

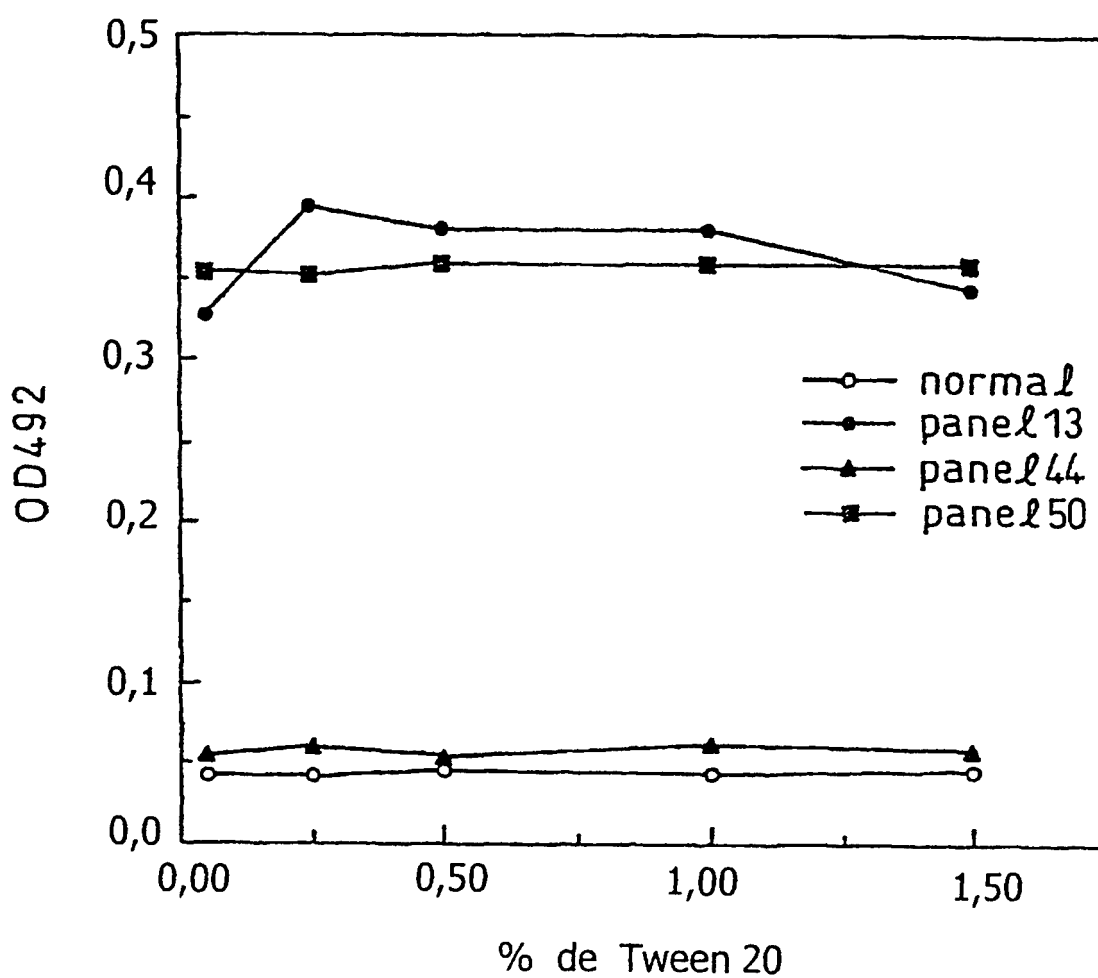


Fig.13

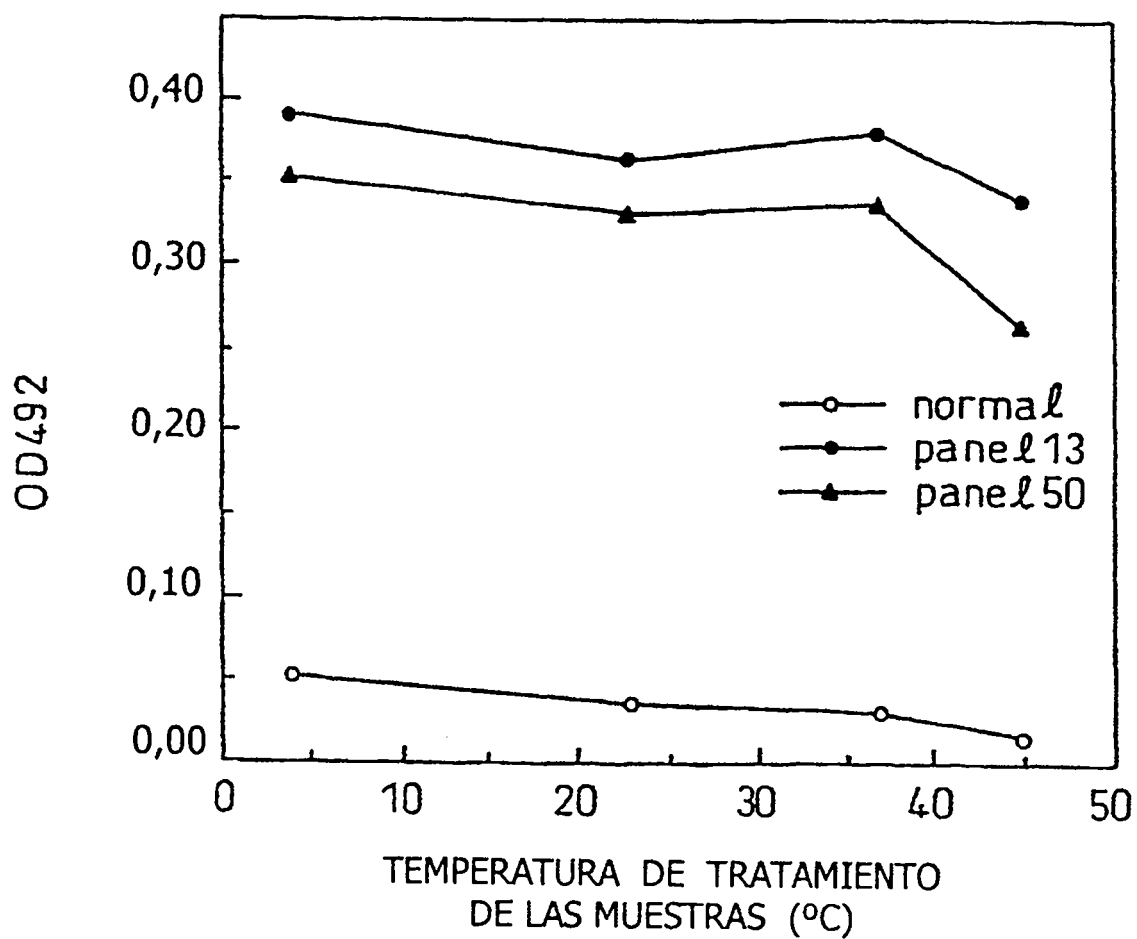


Fig.14

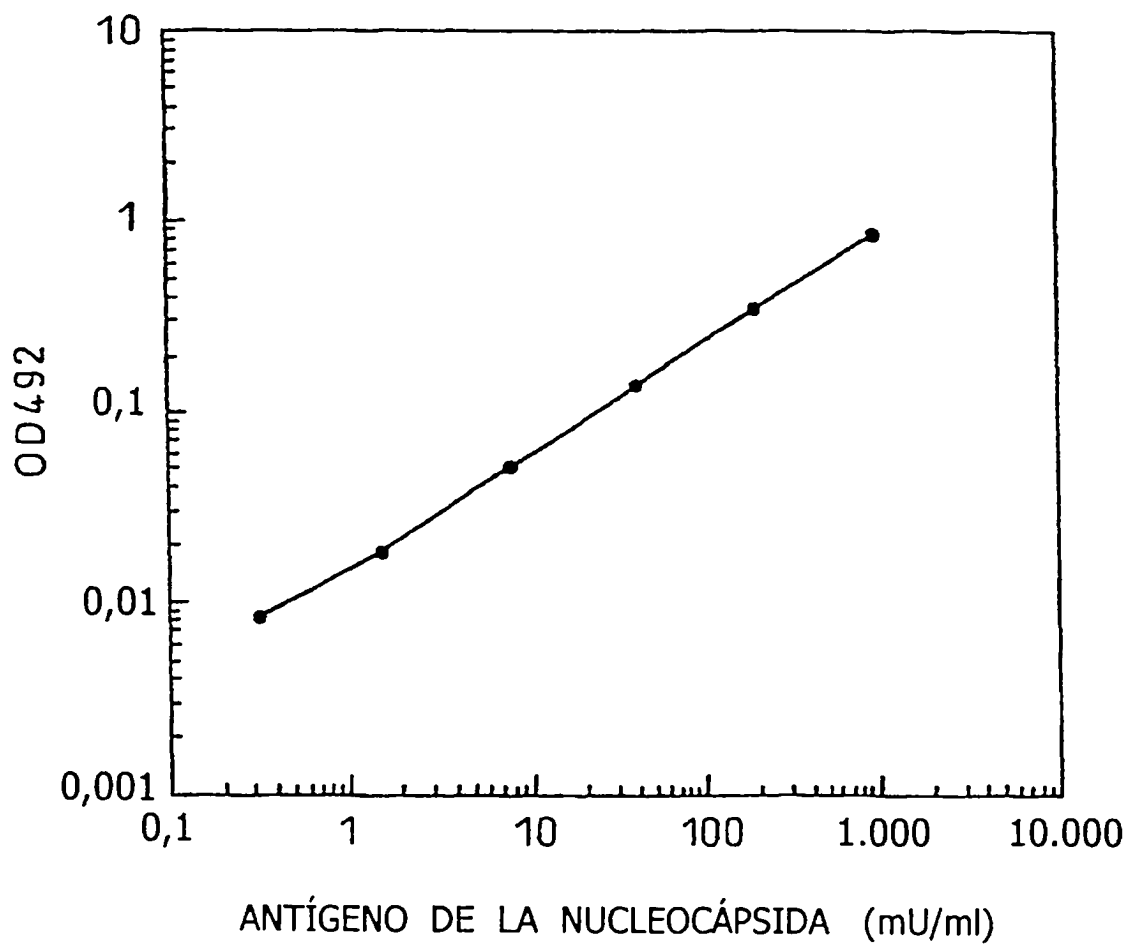


Fig.15

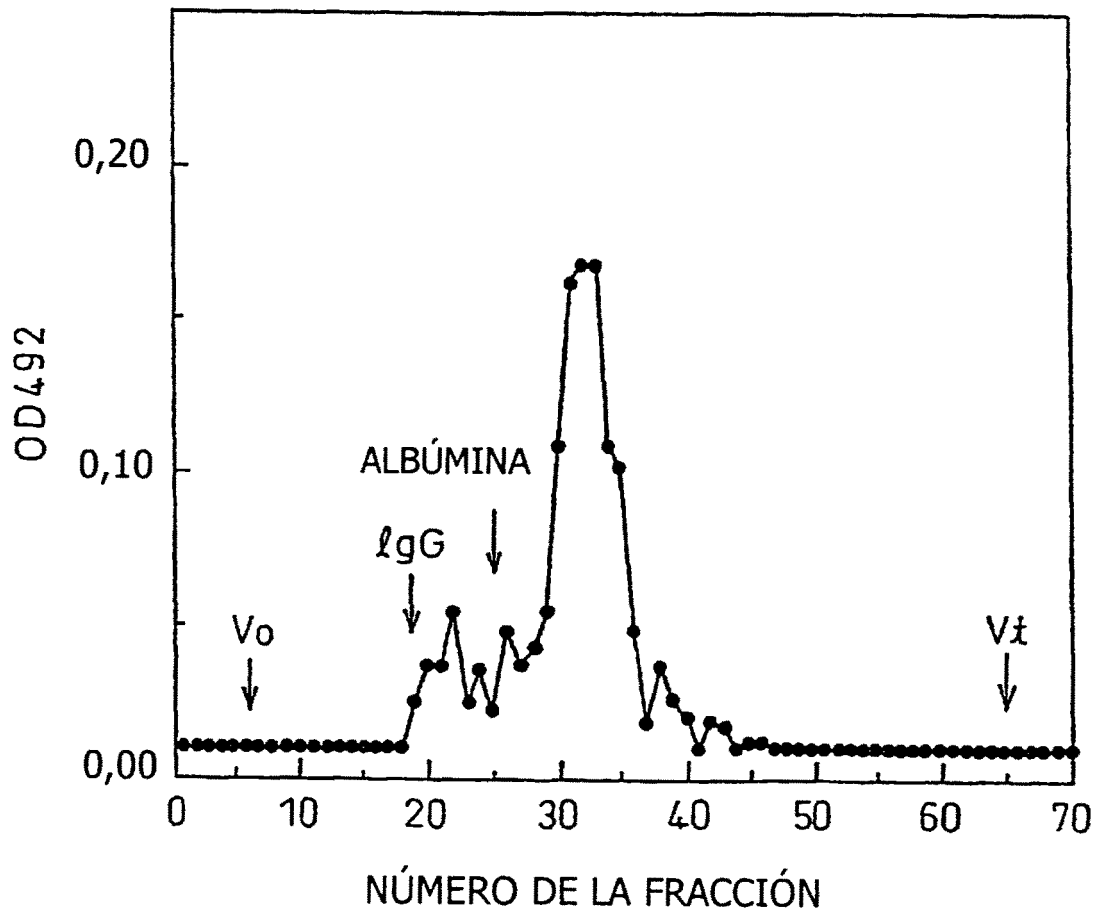


Fig.16

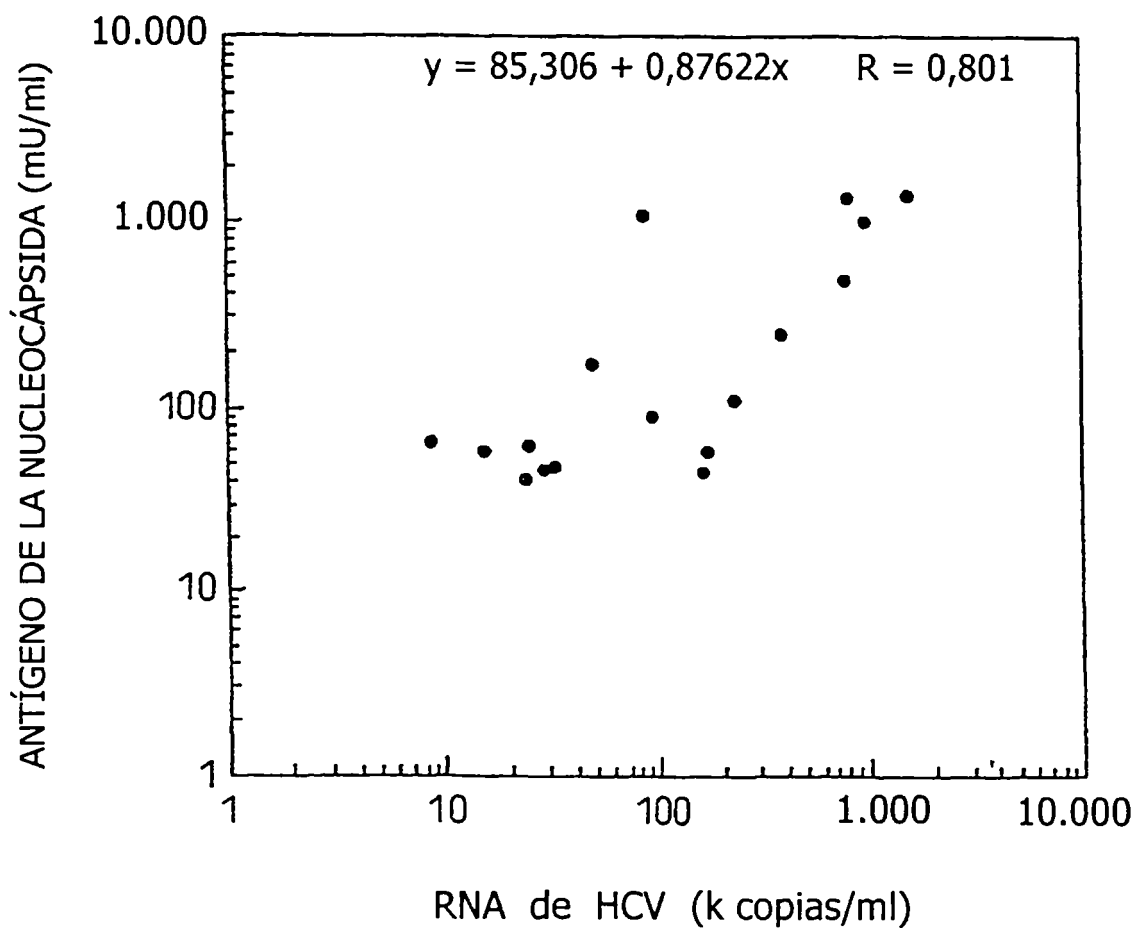
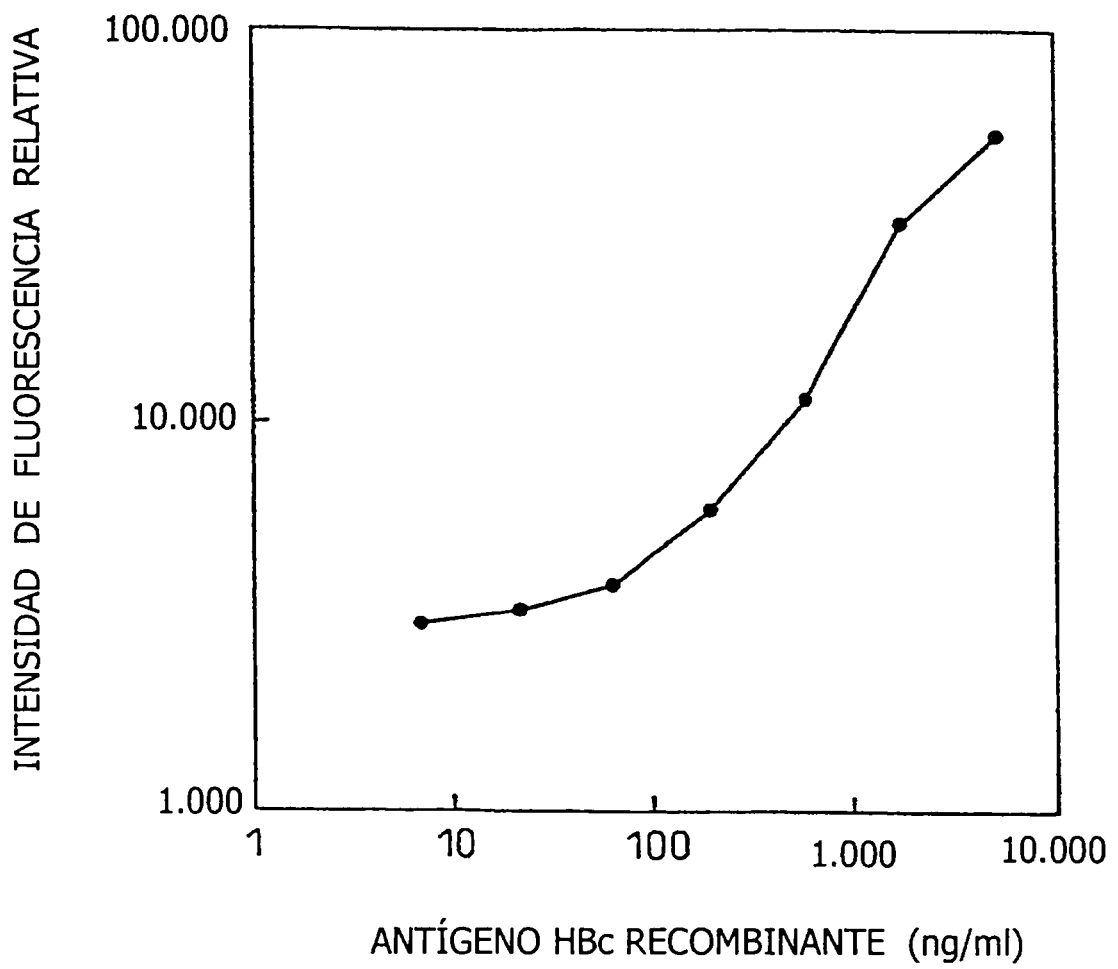


Fig.17



ES 2 286 852 T3

<400> 4
Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg
1 5 10
5
<210> 5
<211> 21
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223>
15
<400> 5
Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg His Arg
1 5 10 15
20 Ser Arg Asn Val Gly
20
25
<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<230>
35
<400> 6
Asp Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu
1 5 10 15
Thr Cys Gly Phe
20
40
<210> 7
<211> 24
<212> DNA
45 <213> Secuencia artificial
<220> Sonda
<230> DNA sintético
50
<400> 7
gaattcatgg gcacgaatcc taaa 24
55
<210> 8
<211> 21
<212> DNA
60 <213> Secuencia artificial
<220> Sonda
<230> DNA sintético
65
<400> 8
ttagtctcc agaaccggga c 21