

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 075**

51 Int. Cl.:
C07K 16/10 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03255660 .7**
96 Fecha de presentación: **10.09.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1398325**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2004**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal específico para un epítipo de glicoproteína codificada por el virus de la inmunodeficiencia felina inactivado**

30 Prioridad:
12.09.2002 US 410246 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2012

73 Titular/es:
**WYETH LLC
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:
Chengjin, Michael Huang

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 383 075 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

Anticuerpo monoclonal específico para un epítipo de glicoproteína codificada por el virus de la inmunodeficiencia felina inactivado.

Antecedentes de la invención

5 El virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), originariamente lentivirus linfotrópico T felino, se describió por primera vez por Pederson y col., Science, (1987) 235: 790-793 y se ha identificado en gatos domésticos y guepardos. La infección es endémica en gatos de todo el mundo. Como el VIH, el VIF es una preocupación internacional. De acuerdo con la American Association of Feline Practitioners, hasta uno de cada doce gatos puede dar positivo en un ensayo para VIF. Después de la infección, existe un periodo transitorio de fiebre, linfadenopatía y neutropenia. La mayoría de los gatos se recuperan de esta fase y parecen normales durante meses o años antes de que aparezca la inmunodeficiencia. Debido a esta manifestación de inmunodeficiencia latente, sería excesivamente peligroso utilizar una vacuna de virus vivo para el tratamiento o la prevención del VIF. Aunque se conocen anticuerpos monoclonales específicos para epítipos de antígenos o proteínas antigénicas codificadas por el VIF, es decir, los documentos US 5.177.014 y US 5.219.725, estos anticuerpos no son capaces de reconocer el VIF inactivado. Esto significa que para las vacunas de VIF comerciales actuales, todas las cuales utilizan VIF inactivado, no se conocen anticuerpos monoclonales útiles para la determinación de la cantidad de virus o de la potencia del componente de VIF inactivado en una composición de vacuna.

El documento WO94/20622 desvela un fragmento polipeptídico capaz de inducir anticuerpos neutralizantes contra el VIF, el documento WO92/15684 desvela la proteína gag p24 y la glicoproteína 160 del VIF recombinante. El documento WO90/06510 desvela anticuerpos monoclonales contra el lentivirus linfotrópico T felino.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo de una glicoproteína de VIF inactivado.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la determinación de la cantidad de un VIF inactivado.

25 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento para determinar la potencia de una vacuna de VIF inactivado.

Una característica de la presente invención es que el anticuerpo monoclonal de la invención es específico para el epítipo de una glicoproteína de VIF inactivado y no reconoce epítipos de glicoproteínas, proteínas o antígenos de VIF vivo.

30 Otros objetos y características de la invención se harán más evidentes a partir de la descripción detallada expuesta a continuación en el presente documento.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo único para una glicoproteína codificada por el virus de la inmunodeficiencia felina inactivado, seleccionada del grupo que consiste en gp95 o gp130, en el que el anticuerpo monoclonal reacciona específicamente con o reconoce el epítipo de VIF inactivado o la glicoproteína de VIF inactivado, pero no reacciona con ni reconoce el VIF vivo o la glicoproteína de VIF vivo, en el que dicho anticuerpo se produce a partir de la línea celular depositada como número de la ATCC PTA-4837.

40 La presente invención proporciona además un procedimiento para la detección de un epítipo único para una glicoproteína codificada por el virus de la inmunodeficiencia felina inactivado en una muestra, que comprende: poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo único para una glicoproteína codificada por el virus de la inmunodeficiencia felina inactivado para formar un complejo; y detectar dicho complejo.

45 Seleccionada del grupo que consiste en gp95 o gp130, en el que el anticuerpo monoclonal reacciona específicamente con o reconoce el epítipo de VIF inactivado o la glicoproteína de VIF inactivado, pero no reacciona con ni reconoce el VIF vivo o la glicoproteína de VIF vivo, en el que dicho anticuerpo se produce a partir de la línea celular depositada como número de la ATCC PTA-4837.

Breve descripción del dibujo

La FIG. 1 es una fotografía de un análisis de inmunotransferencia de Western del anticuerpo monoclonal, AcM 1 D9, identificado como específico para un epítipo único de una glicoproteína codificada por el virus de la inmunodeficiencia felina inactivado.

La FIG 1 se describe además de la forma siguiente: Inmunoprecipitación de glicoproteínas de la envuelta del VIF con el anticuerpo monoclonal 1D9. Una reserva de virus enriquecida en VIF inactivado con formalina se biotiniló con sulfo-NHS-LC-biotina y se extrajo con Triton X-100. La inmunoprecipitación se llevó a cabo por incubación del

extracto con el AcM 1 D9 o H5332. Los inmunocomplejos se recogieron sobre Proteína G inmovilizada, se lavaron y se sometieron a SDS-PAGE y transferencia de Western. Las proteínas en la transferencia se detectaron usando estreptavidina marcada con peroxidasa. Carriles 1 y 5, marcador de peso molecular biotinilado; carril 2, 20 ul de AcM 1 D9 usado para la inmunoprecipitación; carril 3, 100 ul de 1 D9 usado para la inmunoprecipitación; carril 4, 100 ul de un anticuerpo monoclonal irrelevante, H5332, usado en la inmunoprecipitación. Las cadenas H (50 Kd) y L (25 Kd) de los anticuerpos y alguna BSA (67 Kd) no se tiñeron específicamente por la estreptavidina marcada con peroxidasa.

Descripción detallada de la invención

La glicoproteína de la envuelta del virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) está implicada en interacciones de receptores con células, y esta interacción determina la susceptibilidad de las células a dicho virus. La glicoproteína de la envuelta del VIF también está implicada en la penetración del virus y en la formación de sincitios, y es la diana primaria para respuestas inmunes humorales y celulares. (Bendinelli, M., y col., Clinical Microbiology Review, (1995) 8: 87-112). Dicha glicoproteína de la envuelta consiste en dos componentes que están unidos no covalentemente en el virión, la proteína de superficie (SU), que está fuertemente glicosilada y tiene un peso molecular aparente de 95.000-100.000, y la proteína transmembrana (TM), que está menos glicosilada y tiene un peso molecular aparente de 35.000-40.000. (Pacino, G. y col., Virology, (1995) 206: 796-806). Diversos estudios han sugerido que la proteína de la envuelta del VIF es capaz de inducir inmunidad protectora frente al VIF en gatos. Por lo tanto, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) que mide la cantidad relativa o pureza de la proteína de la envuelta del VIF sería más útil para determinar la potencia de una vacuna para el VIF. Sin embargo, todas las vacunas para el VIF disponibles en el mercado en la actualidad utilizan virus muerto o inactivado, y los anticuerpos monoclonales que se sabe que reaccionan con o reconocen el VIF o la glicoproteína del VIF no reaccionan con ni reconocen el VIF o la glicoproteína del VIF inactivado. Se propone que la inactivación de dicho virus puede alterar la conformación de la proteína de la envuelta del VIF.

Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que el anticuerpo monoclonal, denominado AcM 1 D9, reconoce específicamente sólo el VIF inactivado y no reconoce el VIF vivo. Además, los experimentos de ELISA e inmunoprecipitación demuestran que el anticuerpo monoclonal de la invención reacciona específicamente con el componente de proteína de superficie de la glicoproteína de la envuelta del VIF.

La expresión anticuerpo monoclonal, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, designa un anticuerpo producido a partir de una sola célula productora de anticuerpo que se ha clonado para producir una línea celular productora de anticuerpo. El término epítipo designa una secuencia de aminoácidos específica, secuencia de aminoácidos modificada o estructura secundaria o terciaria de proteína que es reconocida por un anticuerpo. La expresión virus inactivado designa un virus "no vivo" o "muerto".

El anticuerpo monoclonal de la invención puede prepararse usando técnicas convencionales conocidas en la materia. Por ejemplo, pueden inmunizarse ratones con un virus inactivado parcialmente purificado tal como VIF-Shiz, VIF-Petaluma o similar, preferentemente VIF-Shiz; después se exploran extracciones de sangre de la cola de ratón para determinar la respuesta de anticuerpos y se seleccionan para la fusión; después, las células de hibridoma clonadas se seleccionan y se exploran para determinar la reactividad específica con el VIF inactivado. El hibridoma para el clon estable individual así obtenido puede cultivarse en un biorreactor y pueden combinarse múltiples recolecciones del anticuerpo para generar el anticuerpo monoclonal deseado, AcM 1D9.

Dicho anticuerpo puede producirse por una línea celular depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo y a la que se asignó el número de la ATCC PTA-4837.

La inactivación del virus puede conseguirse por medios de inactivación convencionales, por ejemplo, inactivación química usando agentes químicos inactivantes tales como etilenimina binaria, fenol, α -lactopropionato, beta-propiolactona, formalina, mertiolato, glutaraldehído, dodecil sulfato sódico, o similares, o una mezcla de los mismos, preferentemente formalina. Dicho virus también puede inactivarse por calor o psoraleno en presencia de luz ultravioleta.

El anticuerpo monoclonal de la invención es específico para VIF inactivado y forma una interacción suficientemente fuerte con un epítipo único para una glicoproteína de la envuelta de VIF inactivado, tal como gp 95 o gp 130, que será útil en un ensayo para la determinación de la cantidad de un virus inactivado o para la potencia de una vacuna de VIF inactivado. Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para la detección de un epítipo único para una glicoproteína codificada por VIF inactivado en una muestra, que comprende: poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo único para una glicoproteína codificada por VIF inactivado para formar un complejo; y detectar dicho complejo.

Las muestras adecuadas para su uso en el procedimiento de la invención incluyen las que contienen un virus inactivado o células infectadas con virus inactivado en un medio de cultivo o en una composición de vacuna.

Los medios de detección del complejo adecuados para su uso en el procedimiento de la invención incluyen cualquier medio convencional usado generalmente para detectar complejos de anticuerpo monoclonal-proteína, tales como detección mediante anticuerpo anti-ratón marcado con enzima, fluorocromo o biotina, detección mediante Proteína A

o similares. En la práctica real, el procedimiento de la invención puede llevarse a cabo en forma de un ensayo de ELISA o inmunoprecipitación que tenga el anticuerpo monoclonal, AcM 1D9, como el anticuerpo de detección.

5 Para una comprensión más clara de la invención, se exponen a continuación los ejemplos siguientes. Estos ejemplos son simplemente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance o los principios subyacentes de la invención de ningún modo. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, se harán evidentes para los expertos en la materia a partir de los ejemplos expuestos a continuación en el presente documento y de la descripción anterior. Dichas modificaciones también pretenden incluirse en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se señale otra cosa, todas las partes son partes en peso.

10 Ejemplo 1

Preparación de un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo de una glicoproteína codificada por VIF inactivado

Células y virus

15 El VIF-Shizuoka (VIF-Shiz, un VIF de subtipo D) se propagó en líneas celulares linfoides persistentemente infectadas derivadas de VIF-Shizuoka y FeT-J (N° Acceso ATCC CRL 11967), una línea celular independiente de IL-2, denominada Shiz. Una línea celular persistentemente infectada con VIF-Shizuoka también está depositada en la ATCC con el N° de Acceso CRL 11976. Para generar reservas de antígenos, los fluidos con virus se inactivaron usando formalina y se concentraron usando ultrafiltración.

20 También se preparan de forma similar reservas de antígenos a partir de una diversidad de otras cepas y subtipos de VIF, tales como, aislados de campo, VIF cepa NCSU 1 (N° Acceso ATCC VR-2333), VIF cepa UC24818 (N° Acceso ATCC VR-2619), VIF-Petaluma (subtipo A, N° Acceso ATCC VR-2186), VIF-Dixon (subtipo A), VIF-UK8 (subtipo A), VIF-Bangston (subtipo B), VIF-Amori-1 (subtipo B), VIF-Amori-2 (subtipo B), propagados en líneas celulares apropiadamente susceptibles y líneas de linfocitos T felinos dependientes o independientes de IL-2, tales como, PMBC, CRFK, NYA-1 (N° Acceso ATCC CRL-2417), FeT-1M (N° Acceso ATCC CRL-10775), FeT-2D (N° Acceso ATCC 10774), Fet-1C (N° Acceso ATCC CRL-11968), FL-4 (N° Acceso ATCC 10772), FL-6 (N° Acceso ATCC 10773), o propagados en líneas celulares persistentemente infectadas con VIF derivadas a partir de las mismas, tales como la línea celular VIF-CRFK que tiene el N° Acceso ATCC VR-1312, la línea celular infectada con VIF-Bangston depositada con el N° Acceso ATCC 11975, y similares, tales como las desveladas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.254.872.

30 Generación de anticuerpo monoclonal

35 Se inmunizaron ratones Balb/c dos veces con virus VIF-Shiz tratado con formalina que se purifica usando la técnica de gradiente de glicerol. El sitio de inyección fue subcutáneo para ambas inyecciones. Se exploraron extracciones de sangre de la cola de ratón para determinar la respuesta de anticuerpos. Un ratón que presentaba altos títulos de anticuerpos específicos de VIF se seleccionó para la fusión. Los esplenocitos recogidos de este ratón se fusionaron con células de mieloma SP2/0. Las células de hibridoma se seleccionaron como se describe en "Antibodies: A Laboratory Manual" por Ed Harlow y David Lane para Cold Spring Harbor Press. Los clones de hibridoma primarios se exploraron para determinar la reactividad específica con VIF-Shiz tratado con formalina. Se obtuvo un clon estable, AcM 1D9. El hibridoma para el AcM 1D9 se cultivó en un biorreactor Heraeus miniPERM. Se obtuvieron múltiples recolecciones del anticuerpo y se combinaron para generar una gran cantidad de AcM 1D9.

40 Ejemplo 2

Uso del anticuerpo monoclonal, AcM 1D9, como un anticuerpo de detección en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

45 En esta evaluación, se usa aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) para capturar las glicoproteínas. Este ELISA de GNA combina la alta selectividad de la unión de GNA con su amplia reactividad con las glicoproteínas de VIH-1, VIH-2, VIS y VIF. Para comenzar, se revistieron placas de noventa y seis pocillos con 10 µg/ml de GNA en carbonato 50 mM, pH 9,6 durante 1 h a 37°C. Después de bloquear los pocillos con PBS-FBS al 10% durante 2 h a 37°C, se añadieron muestras que se trataron con Empigen BB al 1% (Calbiochem) durante 1 h a 37°C, y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Los antígenos no unidos se eliminaron por lavado 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. El anticuerpo monoclonal del Ejemplo 1, AcM 1D9 diluido a 1:8.000, se añadió a cada pocillo y la placa se incubó a 37°C durante 1 h. Después del lavado, se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa, Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL), diluido 1:1.000, y la placa se incubó a 37°C durante 1 h, y después se lavó y se reveló con sustrato de peroxidasa TMB (KPL). La placa se leyó a 650 nm menos 490 nm después de un periodo de reacción de 5 min.

Ejemplo 3**Uso del anticuerpo monoclonal, AcM 1D9, como un anticuerpo de detección en un ensayo de inmunoprecipitación**

5 En esta evaluación, una reserva de virus enriquecida para el virus VIF-Petaluma inactivado con formalina (0,38 mg de proteína total, siendo menos del 5% proteínas de VIF) se incubó con 5 mg de sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce) en 2 ml de PBS en hielo durante 1 h. Después de eliminar el reactivo de biotina no incorporado mediante diálisis, la muestra que contenía virus se extrajo durante 1 h con Triton X-100 al 1% en 12 ml de PBS y se centrifugó a 100.000 g durante 2 h. El sobrenadante se recuperó y se usó para inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación se llevó a cabo por incubación de 600 μ l del extracto con 80 μ l de AcM 1 D9 o AcM H5332 a 4°C durante 1 h. El AcM H5332, que tiene una especificidad por la proteína OspA de Borrelia, se usó como el control de anticuerpo irrelevante. Los inmunocomplejos se recogieron sobre Proteína G inmovilizada (Pierce), se lavaron 4 veces con PBS-NP-40 al 1% frío, se resuspendieron en tampón de Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE y transferencia de Western. La transferencia se bloqueó durante 60 min con SuperBlock (Pierce) y después se incubó durante 45 min con estreptavidina marcada con peroxidasa (KPL), diluida 1:400.000. La membrana se lavó 4 veces con PBS-Tween-20 al 0,05%, y los complejos de biotina-estreptavidina se detectaron con el kit de detección de quimioluminiscencia SuperSignal (Pierce), seguido de exposición a una película de rayos X.

Ejemplo 4**Evaluación de la especificidad del anticuerpo monoclonal, AcM 1D9****Células y virus**

20 El VIF-Shizuoka (VIF-Shiz) y el VIF-Petaluma se propagaron en líneas celulares linfoides persistentemente infectadas denominadas Shiz y FL-6, respectivamente. El virus de la leucemia felina (VLFe) se propagó en una línea celular crónicamente infectada. El calicivirus felino (CVF), el virus de la rinotraqueítis viral felina (RVF) y el virus de la panleucopenia felina (VPF) se cultivaron en células de riñón felino de Crandell. Para generar reservas de antígenos, los fluidos con virus se inactivaron con formalina y se concentraron usando ultrafiltración.

25 Evaluación

En esta evaluación, la especificidad del AcM 1D9 se determinó usando las técnicas tanto de ELISA como de inmunoprecipitación descritas anteriormente en el presente documento en los Ejemplos 2 y 3.

A - Elisa de GNA

30 Se ensayaron diversas muestras de antígenos usando el ensayo descrito en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla I a continuación.

Tabla I

Muestra de antígeno	Concentración de muestra de antígeno	Valor de densidad óptica $A_{650}-A_{492}$
Virus VIF-Shiz, inactivado	1x	0,572
Virus VIF-Petaluma inactivado	1x	0,385
Virus VIF-Shiz, vivo	1x	<u>0,006</u>
Virus VIF-Petaluma, vivo	1x	<u>0,006</u>
FetJ TCS, inactivado	1x	0,027
VLFe, inactivado	1x	0,020
CVF, inactivado	1x	0,027
RVF, inactivado	1x	0,027
VPF, inactivado	1x	0,026
VLFe, vivo	$10^{6,63}$ DICT ₅₀ /ml	0,039
CVF, vivo	$10^{7,67}$ DICT ₅₀ /ml	0,035
RVF, vivo	$10^{7,46}$ DICT ₅₀ /ml	0,039

(continuación)

Muestra de antígeno	Concentración de muestra de antígeno	Valor de densidad óptica $A_{650-A_{492}}$
VPF, vivo	$10^{6,75}$ DICT ₅₀ /ml	0,051
Control sin antígeno	0	0,033

Observaciones

5 Cuando se usaba a una dilución 1:8000, el AcM 1D9 reaccionaba bien con muestras tanto de VIF-Shiz inactivado como de VIF-Petaluma inactivado. Por el contrario, el AcM 1D9 no mostraba reacción cuando se ensayaba con muestras de VLFe, CVF, RVF y VPF vivo o reservas de antígenos inactivados para esos diversos virus. Ventajosamente, el AcM 1D9 no reacciona con muestras de VIF-Petaluma vivo o VIF-Shizuoka vivo aun cuando reacciona bien con muestras tanto de VIF-Shiz inactivado como de VIF-Shiz inactivado. Los datos de ELISA en la Tabla I indicaban que el ELISA de GNA basado en el anticuerpo monoclonal AcM 1D9 puede usarse para detectar específicamente la glicoproteína de VIF. La observación de que el AcM 1D9 reaccionaba con VIF inactivado con formalina, no con VIF vivo, indica que el epítipo reconocido por el AcM 1D9 es un epítipo único creado por el tratamiento con formalina del VIF.

B - Inmunoprecipitación

15 Para confirmar adicionalmente la especificidad del AcM 1D9 por la glicoproteína de la envuelta del VIF inactivado, una reserva enriquecida con VIF inactivado se biotiniló e inmunoprecipitó como se ha descrito en el Ejemplo 3 con el AcM 1D9 o el AcM H5332, un anticuerpo monoclonal irrelevante. Como se muestra en la Figura 1, el AcM 1D9 reaccionaba específicamente con la proteína SU, como se indica por la amplia banda de 95-100 Kd. La banda con un mayor peso molecular (aproximadamente 160 Kd) podría ser un complejo de SU con otra proteína que se entrecruzaba por tratamiento con formalina.

Conclusión

20 Los resultados de los experimentos de ELISA e inmunoprecipitación demostraron que el anticuerpo monoclonal AcM 1D9 reaccionaba específicamente con el componente de proteína de superficie de la glicoproteína de la envuelta de VIF, y es adecuado para su uso en un ensayo de potencia para vacunas de VIF inactivado, o para la determinación de la cantidad de una muestra de virus inactivado o una muestra de células infectadas con virus inactivado.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal específico para un epítipo único para una glicoproteína codificada por VIF inactivado, seleccionada del grupo que consiste en gp95 o gp130, en el que el anticuerpo monoclonal reacciona específicamente con o reconoce el epítipo de VIF inactivado o de glicoproteína de VIF inactivado, pero no reacciona con ni reconoce el VIF vivo o la glicoproteína de VIF vivo, en el que dicho anticuerpo se produce a partir de la línea celular depositada como número de la ATCC PTA-4837.
2. Anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el VIF inactivado es VIF-Shiz o VIF-Petaluma.
3. Anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha glicoproteína es gp95.
4. Anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho VIF es VIF-Shiz.
5. Anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho VIF se ha inactivado por tratamiento con formalina.
6. Un procedimiento para la detección de un epítipo único para una glicoproteína codificada por VIF inactivado en una muestra, que comprende: poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 específico para un epítipo único para una glicoproteína codificada por VIF inactivado para formar un complejo; y detectar dicho complejo.
7. Un procedimiento para determinar la cantidad de un VIF inactivado en una muestra, que comprende: poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 para formar un complejo; y detectar dicho complejo.
8. Un procedimiento para determinar la potencia de un VIF inactivado en una muestra, que comprende: poner en contacto dicha muestra con un monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 para formar un complejo; y detectar dicho complejo.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
10. Un procedimiento para la preparación de anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende inmunizar a un ratón con un VIF inactivado parcialmente purificado, explorar el huésped para una alta respuesta de anticuerpos específicos de VIF, fusionar esplenocitos de dicho huésped con una línea celular de mieloma adecuada para generar células de hibridoma, explorar dichas células de hibridoma para una reactividad específica con VIF inactivado, y después seleccionar un clon estable, cultivar dicho clon estable y recoger los anticuerpos monoclonales deseados.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el VIF inactivado es VIF-Shiz o VIF-Petaluma.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que dicho VIF es VIF-Shiz.
13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que dicho VIF ha sido inactivado por tratamiento con formalina.
14. La línea celular depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el N° de Acceso PTA-4837.

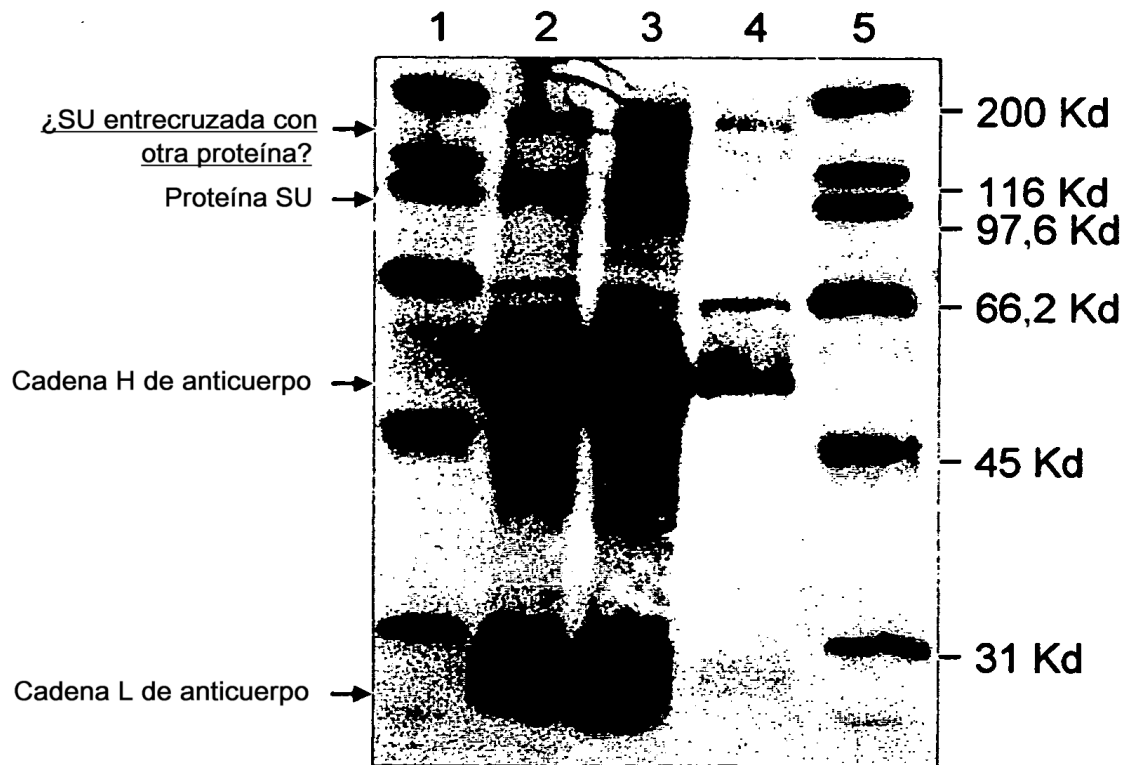


FIG.1