

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 497**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10151641 .7**
96 Fecha de presentación: **08.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2193802**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2010**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales neutralizantes contra el coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo**

30 Prioridad:
08.02.2005 US 651046
31.05.2005 US 141925

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.07.2012

73 Titular/es:
THE NEW YORK BLOOD CENTER, INC.
310 EAST 67TH STREET
NEW YORK, NEW YORK 10021, US

72 Inventor/es:
Jiang, Shibo y
He, Yuxian

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 384 497 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).

DESCRIPCION

Anticuerpos monoclonales neutralizantes contra el coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo.

Antecedentes de la invención

5 El síndrome respiratorio agudo severo (SARS) es una enfermedad respiratoria inferior severa febril reconocida recientemente que es el resultado de una infección causada por un nuevo coronavirus (SARS-CoV) (1-5). El brote global del SARS se contuvo, pero se mantienen las preocupaciones sobre la posibilidad de futuras recurrencias, especialmente con recientes informes de infecciones adquiridas en laboratorios (6). Sin embargo, actualmente no existe disponible un tratamiento o profilaxis eficaz para combatir este virus mortal (7,8).

10 Al igual que otros coronavirus, el SARS-CoV, es un virus envuelto que contiene un genoma de ARN de hebra positiva, grande, que codifica proteínas estructurales y proteínas replicasa víricas que incluyen proteínas espicular (S), de membrana (M), de envoltura E), nucleocápsida (N), y diversas proteínas sin caracterizar (4,5,9). Los análisis filogenéticos indican que el SARS-CoV es distinto de los tres grupos antigénicos conocidos de coronavirus. Por ello, la caracterización post-genómica del SARS-CoV es importante para desarrollar productos terapéuticos y vacunas anti-SARS (10,11).

15 La infección por coronavirus se inicia por la unión de la proteína S al receptor huésped específico, lo cual inicia un cambio de conformación en la proteína S. La proteína S del SARS-CoV es una glucoproteína transmembrana de tipo I con una longitud predicha de 1.255 aminoácidos que contienen un líder (restos 1-14), un ectodominio (restos 15-1190), un dominio transmembrana (restos 1191-1227), y una cola intracelular corta (restos 1227-1255) (5). A diferencia de muchos otros coronavirus, tal como el virus de la hepatitis del ratón (MHV) (12,13), en el cual la proteína S está escindida post-traducción dentro de subunidades S1 y S2, no se ha identificado un motivo de escisión típico en la proteína S del SARS-CoV (5). No obstante, sus dominios S1 y S2 fueron predichos mediante la alineación de secuencias con otras proteínas S de coronavirus (5,14). El dominio S2 (restos 681-1255) de la proteína S del SARS-CoV que contiene un péptido de fusión putativo y dos regiones setenas repetidas (HR1 y HR2) es responsable de la fusión entre membranas de célula vírica y diana. Se ha encontrado que las regiones HR1 y HR2 pueden asociarse para formar una estructura en haz de seis hélices (15-18), que se parece al núcleo activo de fusión de la gp41 del VIH (19) y la proteína S del MHV (20,21). El dominio S1 de la proteína S del SARS-CoV media en la unión del virus con la enzima de conversión de la angiotensina 2 (ACE2), el receptor funcional para el SARS-CoV sobre células susceptibles (22-25). Recientemente, se ha identificado un pequeño fragmento de 193 aminoácidos dentro del dominio S1 (restos 318-510) como un dominio de unión del receptor (RBD), el cual es suficiente para asociarse con ACE2 (26-28).

Las proteínas S del coronavirus son determinantes antigénicos principales que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes (29,30). De acuerdo con ello, se deduce lógicamente el uso de la proteína S como un antígeno para el desarrollo de la vacuna (30). Recientemente, se ha mostrado que la proteína S del SARS-CoV es un inductor principal de inmunidad protectora entre proteínas estructurales (31). Yang, y otros (32) han informado que un candidato de vacuna de ADN que codifica la proteína S indujo la neutralización del SARS-CoV (valores de anticuerpo neutralizante dentro del intervalo de desde 1:25 hasta 1:150) e inmunidad protectora en ratones, y se probó que la protección estuvo mediada por anticuerpos neutralizantes pero no por un mecanismo dependiente de la célula T. Bisht, y otros (33) han demostrado que la proteína S del SARS-CoV expresada por el virus vaccinia atenuado (MVA) escindió anticuerpos específicos de S con un valor de anticuerpo neutralizante del SARS-CoV de 1:284, e inmunizó de manera protectora a ratones contra infecciones por SARS-CoV, tal como se muestra mediante los valores reducidos de SARS-CoV en los tractos respiratorios de ratones después de exposición a la infección. Bukreyev, y otros (34) han informado que la inmunización de mucosa de monos verdes de África con virus para-influenza atenuados (BHPV3) que expresan la proteína S del SARS-CoV indujo anticuerpos neutralizantes con valores de neutralización que variaron desde 1:8 hasta 1:16 y protegieron los animales contra la exposición a la infección. Estos datos indican que la proteína S del SARS-CoV es un antígeno protector capaz de inducir anticuerpos neutralizantes, aunque sus determinantes antigénicos permanecen sin ser definidos.

Los autores de la presente invención han demostrado recientemente que el dominio de unión del receptor (RBD) de la proteína S del SARS-CoV es una diana principal de anticuerpos neutralizantes inducida en pacientes infectados con SARS-CoV y en animales inmunizados con virus inactivados o proteínas S (35,36). Por ello, los autores de la presente invención han usado el RBD recombinante de la proteína S del SARS-CoV como un inmunógeno para inducir anticuerpos monoclonales neutralizantes (mABs).

Breve resumen de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal neutralizante aislado capaz de unión al dominio de unión del receptor de la proteína espicular del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), en el que el anticuerpo se produce mediante el hibridoma 30F9 con el No. de Acceso de ATCC PTA-6523.

Además, de acuerdo con la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con la invención y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

Además, de acuerdo con la invención, se proporciona el hibridoma 30F9 con el No. de Acceso de ATCC PTA-6523.

Además, de acuerdo con la invención, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de la infección por SARS-CoV.

5 Además, de acuerdo con la invención, se proporciona el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la infección por SARS-CoV.

Además, de acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para la detección del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) o de células infectadas por SARS-CoV *in vitro*, que comprende poner en contacto un anticuerpo de acuerdo con la invención bajo condiciones que permiten la formación de complejos entre el anticuerpo y el dominio de unión del receptor de la proteína espicular del SARS-CoV, y la detección de los complejos formados.

Además, de acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para el rastreo de compuestos capaces de inhibir la infección por coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), mediante el bloqueo de la unión del virus a los receptores sobre las células huéspedes, que comprende las etapas de:

15 (a) establecer un sistema para un anticuerpo de acuerdo con la invención, para unir al dominio de unión del receptor de la proteína espicular del SARS-CoV; y

(b) poner en contacto un compuesto para ser rastreado con el sistema de (a), indicando una disminución en la unión del anticuerpo al dominio de unión del receptor de la proteína espicular del SARS-CoV que el compuesto es capaz de interferir con la unión y de inhibir la infección del dominio de unión del receptor de la proteína espicular del SARS-CoV.

20 Además, de acuerdo con la invención, se proporciona un kit de diagnóstico o un kit de rastreo que comprende un compartimento que contiene un anticuerpo de acuerdo con la invención.

La presente invención demuestra que el dominio de unión del receptor (RBD) contiene múltiples epítomos de neutralización dependientes de la conformación, que inducen un panel de potentes anticuerpos monoclonales neutralizantes (mAbs), los cuales pueden usarse para el tratamiento, diagnóstico, y prevención del SARS.

25 **Breve descripción de las diferentes vistas de los dibujos**

Figura 1. (no de acuerdo con la invención). Mapaje del epítomo de los mAbs 4D5 y 17H9 mediante péptidos de solapamiento que cubren el RBD de la proteína S. Cada uno de los péptidos se recubrió a una concentración de 5 µg/ml y los mAbs se ensayaron a una concentración de 10 µg/ml.

30 Figura 2. Inhibición de la unión de RBD-Fc a la ACE2 mediante mAbs. El panel superior muestra la inhibición de la unión de RBD-Fc a la ACE2 asociada a la célula, expresada sobre células 293T/ACE2 medida mediante citometría de flujo; el panel inferior muestra la inhibición de la unión de RBD-Fc a la ACE2 soluble medida mediante ELISA. El RBD-Fc se usó a una concentración de 1 µg/ml y los mAbs se usaron a una concentración de 50 µg/ml. El % de inhibición se calculó para cada mAb.

35 Figura 3. Neutralización del pseudovirus SARS mediante mAbs. Se muestra la inhibición de la infección por pseudovirus SARS en células 293T/ACE2 mediante mAbs representativos procedentes de cada grupo. Cada uno de los mAbs se ensayó en unas series de diluciones al doble y se calculó el % de neutralización.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado capaz de unión al dominio de unión del receptor (RBD) de la proteína espicular (S) del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) con el fin de inhibir de manera competitiva la unión del SARS-CoV a las células huéspedes.

La presente invención (no de acuerdo con la invención) proporciona igualmente una sustancia que comprende las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo monoclonal descrito anteriormente, capaz de unión al mismo epítomo que el anticuerpo monoclonal descrito anteriormente. Esta sustancia incluye, pero sin limitarse a ellas, un polipéptido, molécula pequeña, anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo es neutralizante. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla o constructo de fusión de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico, tal como se ha descrito anteriormente. Es la intención de esta solicitud la de cubrir diferentes constructos quiméricos creados usando los anticuerpos inventados. La presente invención cubre igualmente todos los constructos humanizados de los anticuerpos. La técnica de generación de anticuerpos quiméricos o humanizados es bien conocida. Véase, por ejemplo (37,38) para anticuerpos quiméricos y (39-41) para anticuerpos humanizados. Un técnico experto normal puede modificar la secuencia de la sustancia anteriormente descrita a la vista de la presente divulgación. Dicha modificación puede incluir la adición, delección, o mutación de ciertas secuencias de aminoácidos en el fragmento. El procedimiento general para producir un anticuerpo entra dentro del conocimiento de un experto normal en la técnica. Véase, por ejemplo, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No.1, por Ed. Harlow (1998).

En una realización, el anticuerpo aislado descrito anteriormente se acopla directa o indirectamente a más de un agente citotóxico. Dicho agente citotóxico incluye, pero sin limitarse a ellos, radionucleótidos u otras toxinas. La presente invención (no de acuerdo con la invención) proporciona adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anterior. Una vez aislados los anticuerpos, el gen que codifica dicho anticuerpo puede aislarse y determinarse el secuencia de ácido nucleico. De acuerdo con ello, la presente invención (no de acuerdo con la invención) proporciona además una molécula de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente la molécula descrita anteriormente. La molécula de ácido nucleico incluye, pero sin limitarse a ellos, ADN o ARN sintético, ADN genómico, ADNc, y ARN.

La presente invención (no de acuerdo con la invención) proporciona igualmente un vector que comprende las molécula de ácido nucleico anteriores o una porción de las mismas. Esta porción puede ser una porción funcional que porta una cierta función. Un fragmento o una secuencia parcial puede ser capaz de codificar un dominio funcional de la proteína que es funcional. En una realización, este vector es un vector de expresión, mediante el cual puede expresarse la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico. La presente invención proporciona además una célula que comprende la molécula de ácido nucleico anteriormente descrita. Dichas células pueden usarse para expresión. Los vectores son bien conocidos en este campo. Véase, por ejemplo, Graugner, Patente de EE.UU. No. 6.337.208, "Cloning Vector", concedida el 8 de Enero de 2002. Véase, igualmente, Schumacher y otros, Patente de EE.UU. No. 6.190.906, "Expression Vector for the Regulatable Expression of foreign Genes in Prokaryotes", concedida el 20 de Febrero de 2001. En una realización, los vectores son plásmidos. La presente invención proporciona un procedimiento para la producción del anticuerpo capaz de unión al dominio de unión del receptor (RBD) de la proteína espicular (S) del SARS-CoV con el fin de inhibir de manera competitiva la unión del SARS-CoV a las células huéspedes, el cual comprende el ligado de manera operativa de la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente al elemento regulador apropiado con el fin de expresar dicho anticuerpo; la disposición de la molécula nucleica ligada en condiciones apropiadas que permitan la expresión de dicho anticuerpo; y la recuperación de dicho anticuerpo expresado, produciendo, de esta forma, dicho anticuerpo. La presente invención proporciona también un anticuerpo producido mediante el procedimiento anterior.

Las líneas de células de hibridoma 32H5 (Conf I), 31H12 (Conf II), 18D9 (Conf III), 30F9 (Conf IV), 33G4 (Conf V), y 19B2 (Conf VI), se depositaron el 13 de Enero de 2005 en el American Type Culture Collection (ATCC), 1081 University Blvd., Manassas., VA 20110, U.S.A., bajo las disposiciones del Budapest Treaty for the International Recognition of the Deposit of Microorganism for the Purposes of Patent Procedure. A las líneas de células 32H5 (Conf I), 31H12 (Conf II), 18D9 (Conf III), 30F9 (Conf IV) (de acuerdo con la invención), 33G4 (Conf V), y 19B2 (Conf VI), se las concedieron los Números de Acceso de ATCC PTA-6525, PTA-6524, PTA-6521, PTA-6523, PTA-6526, y PTA-6522, respectivamente.

La presente invención (no de acuerdo con la invención) proporciona igualmente epítomos reconocidos por los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente. Dichos epítomos, secuenciales o de conformación, son importantes para usos de diagnóstico o terapéutico.

La presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal descrito anteriormente de acuerdo con la invención y un vehículo adecuado. La cantidad eficaz puede determinarse mediante experimentación rutinaria. La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal descrito anteriormente y un vehículo aceptable farmacéuticamente. Tal como se usa en la presente invención, un vehículo aceptable farmacéuticamente significa cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales. Los ejemplos de vehículos adecuados son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato, solución salina tamponada con fosfato conteniendo Polysorb 80, agua, emulsiones tales como emulsión aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Otros vehículos pueden incluir también soluciones estériles, comprimidos, comprimidos recubiertos, y cápsulas. Típicamente, dichos vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales del mismo, estearato magnésico o cálcico, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Dichos vehículos pueden incluir igualmente aditivos de aroma y color u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse mediante procedimientos convencionales bien conocidos.

La presente invención proporciona además un procedimiento para la detección del SARS-CoV (o de células infectadas del SARS-CoV), que comprende poner en contacto el anticuerpo de acuerdo con la invención bajo condiciones que permitan la formación de complejos entre el anticuerpo y el RBD de la proteína S del SARS-CoV; y la detección de los complejos formados.

Finalmente, la presente invención proporciona un procedimiento para el rastreo de compuestos capaces de inhibir la infección del SARS-CoV mediante el bloqueo de la unión de dicho virus a los receptores sobre las células huéspedes, que comprende las etapas de (a) establecer un sistema para que el anticuerpo de la invención se una al dominio de unión del receptor (RBD) de la proteína espicular (S) del SARS-CoV; y (b) poner en contacto los compuestos con el sistema de (a), con lo cual una disminución en la unión del anticuerpo anterior al RBD de la proteína S del SARS-CoV indica que los compuestos son capaces de interferir con dicha unión, inhibiendo, de esa forma, la infección del RBD de la proteína S del SARS-CoV.

La presente invención proporciona un kit que comprende un compartimento que contiene un anticuerpo de acuerdo con la invención capaz de reconocer el virus del SARS y/o una sustancia que puede inhibir de manera competitiva la unión de dicho anticuerpo.

5 La presente invención demuestra que el RBD contiene múltiples epítopos de neutralización dependientes de la conformación, los cuales inducen un panel de potentes anticuerpos monoclonales neutralizantes (mAbs), los cuales pueden usarse para el tratamiento, diagnóstico y prevención del SARS.

La invención se entenderá mejor con referencia a los Detalles Experimentales que siguen a continuación.

Detalles Experimentales

10 Se generaron veintisiete clones de hibridomas mediante la fusión de células de mieloma SP2/0 con los esplenocitos procedentes ratones Balb/c inmunizados con una proteína de fusión que contenía un dominio de unión del receptor (RBD) en la proteína espicular (S) del SARS-CoV ligado al fragmento Fc de IgG1 humano (designado como RBD-Fc). Entre los 27 anticuerpos monoclonales (mAbs) producidos a partir de estos clones de hibridoma, excepto 2 mAbs unidos a los epítopos lineales adyacentes, todos los otros mAbs reconocieron epítopos dependientes de la conformación. En base a los resultados obtenidos a partir de los experimentos de competencia de unión, estos 25 mAbs específicos de la conformación pudieron dividirse en seis grupos, designados como Conf I-VI. Los mAbs Conf IV y Conf V bloquearon significativamente la unión de RBD-Fc a ACE2, el receptor para el SARS-CoV, lo que sugiere que sus epítopos se solapan con los sitios de unión del receptor en la proteína S. La mayoría de los mAbs (23/25) que reconocieron los epítopos de conformación poseyeron potentes actividades neutralizantes contra el pseudovirus SARS con una dosis neutralizante al 50% (ND₅₀) comprendida dentro del intervalo de desde 0,005 hasta 6,569 µg/ml.

20 Estos mAbs neutralizantes del SARS-CoV pueden usarse: 1) como productos inmunoterapéuticos para el tratamiento temprano de la infección por SARS-CoV; 2) como reactivos biológicos para la diagnosis de la infección por SARS-CoV; 3) como sondas para estudiar la inmunogenicidad, antigenicidad, estructura y función de la proteína S del SARS-CoV. Además, estos mAbs murinos pueden humanizarse para terapia y prevención de infección por SARS-CoV.

Materiales y Procedimientos

30 *Inmunización de ratones y generación de mAbs.* Se inmunizaron cinco ratones Balb/c (4 semanas de edad) subcutáneamente con 20 µg de RBD-Fc purificado con Protein A Sepharose preparado tal como se ha descrito previamente (35) en la presencia de MLP+TDM Adjuvant System (Sigma, Saint Louis, MI) y se reforzaron con 10 µg del mismo antígeno más el adyuvante MLP+TDM a intervalos de 3 semanas. Los antisueros de ratón se recolectaron para la detección de anticuerpos anti-RBD y anticuerpos neutralizantes de SARS-CoV.

35 Se generaron hibridomas para la producción de mAbs anti-RBD usando el protocolo convencional. En resumen, los esplenocitos procedentes de los ratones inmunizados se recolectaron y fusionaron con células de mieloma SP2/0. Los sobrenadantes del cultivo de células procedentes de los pocillos conteniendo las colonias de hibridomas se rastrearon mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) usando S1-C9 preparada tal como ha sido ya descrito previamente (35) como un antígeno de recubrimiento. Las células procedentes de los pocillos positivos se expendieron y volvieron a ensayar. Los cultivos que se mantuvieron positivos se subclonaron para generar líneas de células de hibridoma estables. Todos los mAbs se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo mediante Protein A Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences).

40 *ELISA y competencia de unión.* La reactividad de los sueros de ratón o de mAbs con diversos antígenos se determinó mediante ELISA. En resumen, se usaron 1 µg/ml de proteínas recombinantes (RBD-Fc o S1-C9) o IgG humano purificado (Zymed, South San Francisco, CA), respectivamente, para recubrir placas de microvaloración de 96 pocillos (Coming Costar, Acton, MA) en tampón de carbonato 0,1 M (pH 9,6) a 4°C durante una noche. Después del bloqueo con leche no grasa al 2%, los sueros de ratón se diluyeron de manera seriada o se agregaron mAbs y se incubaron a 37°C durante 1 hora, seguido de cuatro lavados con PBS conteniendo Tween 20 al 0,1%. Los anticuerpos unidos se detectaron con IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Zymed) a 37°C durante 1 hora, seguido de lavados. La reacción se visualizó mediante la adición del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y la absorbancia a 450 nm se midió mediante un lector de placa ELISA (Tecan US, Research Triangle Park, NC).

50 Para determinar el efecto de reducción del enlace disulfuro sobre la unión de mAbs específicos del RBD, la placa ELISA se recubrió con S1-C9 o RBD-Fc recombinante a una concentración de 1 µg/ml y, a continuación, se trató durante 1 hora a 37°C con ditioneitol (DTT) a una concentración de 10 mM, seguido de lavados. A continuación, los pocillos se trataron con yodoacetamida 50 mM durante 1 hora a 37°C. Después de los lavados, se llevó a cabo un ensayo ELISA convencional tal como se ha descrito anteriormente.

55 Se llevó a cabo un ensayo ELISA de competencia con el fin de determinar la actividad inhibidora de los mAbs específicos del RBD sobre la unión de los mAbs biotinilados a RBD-Fc. En resumen, los pocillos de las placas ELISA se recubrieron con RBD-Fc a una concentración de 1 µg/ml tal como se ha descrito anteriormente. Se agregó una mezcla conteniendo 50 µg/ml de un mAb no marcado y 1 µg/ml de un mAb biotinilado, seguido de incubación a 37°C

durante 1 hora. La unión de los mAbs biotinilados se detectó después de la adición de estreptavidina conjugada con HRP (Zymed) y TMB, secuencialmente. La biotinilación de los mAbs se llevó a cabo usando el EZ-link NHS-PEO Solid Phase Biotinylation Kit (Pierce, Rockford, IL), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5 *Neutralización de la infección por pseudovirus SARS.* El ensayo de neutralización convencional que usa SARS-CoV vivo es engorroso y ha de llevarse a cabo en instalaciones BSL-3. Por ello, los autores de la presente invención adaptaron un sistema de pseudovirus de SARS-CoV (27,32,42,43) en el laboratorio de los presentes inventores. Este ensayo es sensible y cuantitativo y puede llevarse a cabo en instalaciones BSL-2. El pseudovirus del SARS que porta la proteína S del SARS-CoV y un genoma del VIH-1 defectuoso que expresa luciferasa como una informadora, se preparó tal como ha sido ya descrito (27,42,43). En resumen, se co-transfirieron células 293T con un plásmido que codifica la proteína S del SARS-CoV optimizada con codón y un plásmido que codifica el genoma de VIH-1 que expresa luciferasa, Env-defectuoso (pNL4-3,1uc.RE) usando reactivos Eugene 6 (Boehringer Mannheim). Los sobrenadantes conteniendo el pseudovirus del SARS se cultivaron durante 48 horas post-transfección y se usaron para la infección del ciclo único de células 293T transfectadas con ACE2 (293T/ACE2). En resumen, las células 10 293T/ACE2 se sembraron en placa a una concentración de 10^4 células/pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos y se desarrollaron durante una noche. Los sobrenadantes conteniendo el pseudovirus se pre-incubaron con mAbs o sueros de ratón diluidos en serie al doble a 37°C durante 1 hora antes de la adición a las células. El cultivo se re-alimentó con medio reciente 24 horas después y se incubó durante un tiempo adicional de 48 horas. Las células se lavaron con PBS y se lisaron usando reactivo de lisis incluido en un kit de luciferasa (Promega, Madison, WI). Se transfirieron partes alícuotas de lisados de células a placas de medición de luz de fondo plano Costar de 96 pocillos (Corning Costar, Coming, NY), seguido de la adición del sustrato de luciferasa (Promega). Las unidades de luz 20 relativas (RLU) se determinaron inmediatamente en el medidor de luz Ultra 384 (Tecan US).

Inhibición de la unión de RBD-Fc con receptor mediante mAbs. La inhibición de mAbs sobre la unión de RBD-Fc a células que expresan ACE2, se midió mediante citometría de flujo. En resumen, se separaron, recolectaron y lavaron 25 10^6 células 293T/ACE2 con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) (Sigma, St Louis, MO). Se agregó RBD-Fc a las células hasta una concentración final de 1 µg/ml en la presencia o ausencia de 50 µg/ml de mAbs, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células se lavaron con HBSS y se incubaron con conjugado IgG-FITC anti-humano (Zymed) a una dilución de 1:50 a temperatura ambiente durante un tiempo adicional de 30 minutos. Después del lavado, las células se fijaron con formaldehído al 1% en PBS y se analizaron en un citómetro de flujo Becton FACSCalibur (Mountain View, CA) usando el software CellQuest.

30 La inhibición de la unión de RBD-Fc a ACE2 soluble mediante mAbs se midió mediante un ensayo ELISA. En resumen, se recubrió ACE2 soluble recombinante (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) a una concentración de 2 µg/ml sobre placas ELISA de 96 pocillos (Corning Costar) en tampón de carbonato 0,1 M (pH 9,6) a 4°C durante una noche. Después de bloqueo con leche no grasa al 2%, se agregó 1 µg/ml de RBD-Fc a los pocillos en la presencia o ausencia de 50 µg/ml de mAbs de ratón y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después del lavado, se agregó IgG anti-humano de cabra conjugado con HRP (Zymed) y se incubaron durante un tiempo adicional de 1 hora. Después 35 del lavado, el sustrato TMB se usó para detección.

Resultados

Aislamiento y caracterización inicial de mAbs específicos para RBD. La proteína de fusión RBD-Fc se expresó transitoriamente en células 293T y se purificó hasta homogeneidad mediante Proteín A. Se inmunizaron cinco ratones (A a E) cuatro veces con RBD-Fc en la presencia de adyuvante Ribí. Todos los animales desarrollaron respuestas anticuerpos apreciables contra RBD-Fc después del primer refuerzo, y sus valores de anticuerpos se incrementaron en las inmunizaciones posteriores. Los antisueros recolectados 4 días después del tercer refuerzo mostraron actividad neutralizante altamente potente contra el SARS-CoV y el pseudovirus del SARS que porta la proteína S del SARS-CoV.

45 Se generó un panel de 27 mAbs específicos del RBD mediante la fusión de esplenocitos procedentes de ratones inmunizados contra RBD-Fc con células de mieloma Sp2/0 y, a continuación, el rastreo de hibridomas con S1-C9 como un antígeno. Las especificidades de los epítomos de estos mAbs se determinaron inicialmente mediante ensayos ELISA usando RBD-Fc, RBD-Fc reducido con DTT, S1-C9, S1-C9 reducido con DTT, y un IgG humano purificado como antígenos de recubrimiento (Tabla I). La mayoría de los mAbs (25/27) fueron reactivos con RBD-Fc y S1-C9 nativos, pero no con RBD-Fc y S1-C9 reducidos con DTT. Esto indica que fueron dirigido contra epítomos de conformación dependientes del enlace disulfuro expresados sobre la proteína S del RBD. Otros dos mAbs (4D5 y 17H9) reconocieron tanto los RBD-Fc y S1-C9 nativos como reducidos, lo que indica que fueron dirigidos contra epítomos lineales presentados sobre el RBD. Ninguno de los mAbs rastreados por S1-C9 reaccionó con IgG humano, en tanto que el antisuero de control procedente de un ratón inmunizado con RBD-Fc fue reactivo con IgG humano (Tabla I).

Puesto que los mAbs 4D5 y 17H9 pudieron reaccionar con el RBD-Fc y S1-C9 reducidos, sus epítomos podrían marse con péptidos sintéticos. Se usó un conjunto de 27 péptidos de solapamiento que cubren el RBD de la proteína S para localizar los epítomos 4D5 y 17H9 mediante ELISA. Tal como se muestra en la Fig. 1, el 4D5 reaccionó con el péptido 435-451 (NYYKYRYLRHGKLRPF), y el 17H9 reaccionó con dos péptidos solapados 442-458 (YLRHGKLRPFERDISNV) y 449-465 (RPFERDISNVPFSPDGK). Aunque el epítomo de 17H9 se mapó claramente a 60

la secuencia solapada (RPFERDISNV) de los péptidos 442-458 y 449-465, el epítipo para 4D5 requiere la mayoría de la secuencia del péptido 435-451 que solapa secuencias parciales de los péptidos 442-458 y 449-465. En consecuencia, estos dos mAbs reconocen los epítipos lineales vecinos que residen dentro del RBD. Ninguno de los mAbs dependientes de la conformación reaccionan con ninguno de los péptidos ensayados (datos no mostrados).

5 *Especificidad del epítipo de los mAbs específicos del RBD determinada mediante ensayos de competencia de unión.* Con el fin de caracterizar los epítipos dependientes de la conformación, los mAbs específicos del RBD se agruparon por ensayos de competencia de unión (Tabla II). Uno de los mAbs (10E7) primeramente se biotiniló y se determinó la actividad inhibitoria de los 27 mAbs sobre la unión de 10E7 a RBD-Fc. Los mAbs 4D5 y 17H9 que reconocen epítipos lineales mapados por los péptidos anteriores se incluyeron en los ensayos de competencia como un control. Aproximadamente la mitad de los mAbs dependientes de la conformación (13/25) compitieron con el 10E7 biotinilado, en tanto que otros mAbs no bloquearon la unión de 10E7 al RBD-Fc. Otros cuatro de los mAbs de no competencia (11E12, 33G4, 45B5, y 17H9) se biotinilaron posteriormente y se ensayaron de manera similar con el ensayo de competencia de unión. Cinco de los 13 mAbs que compiten con el 10E7 biotinilado bloquearon también la unión de 45B5 al RBD-Fc y fueron designados como un grupo separado. De esta forma, los 25 mAbs específicos de la conformación se dividieron en seis grupos de competencia distintos (designados como Conf I-VI). Dos mAbs específicos del epítipo lineal (4D5 y 17H9) no compiten con ninguno de los mAbs específicos de la conformación. Estos resultados sugieren que el RBD de la proteína S contiene múltiples estructuras antigénicas que inducen respuestas anticuerpo específicas en los ratones. Sin embargo, los epítipos inmunodominantes en el RBD son dependientes de la conformación.

20 *Caracterización de los mAbs que bloquean la unión del receptor.* El RBD-Fc pudo unirse de manera eficaz a la ACE2 expresada sobre células 293T/ACE2 y a ACE2 soluble tal como se midió mediante citometría de flujo y ELISA, respectivamente (datos no mostrados). Los autores de la presente invención han ensayado si los mAbs específicos de RBD inhiben la unión de RBD-Fc a ACE2 asociada a células o soluble. Tal como se muestra en la Fig. 2, todos los mAbs procedentes de Conf IV (28D6, 30F9, y 35B5) y de Conf V (24F4, 33G4, y 38D4) bloquearon completamente la unión de RBD-Fc tanto a ACE2 asociada a células como soluble de una manera altamente consistente. La totalidad de los mAbs de Conf III (11E12 y 18D9) y dos de los cuatro mAbs de Conf VI (19B2 y 45F6) inhibieron parcialmente la unión de RBD-Fc a ACE2 expresada sobre células 293T/ACE2 y a ACE2 soluble. Todos los otros mAbs, incluyendo dos mAbs contra secuencias lineales, no tuvieron efecto inhibitorio significativo sobre la unión del receptor. Estos resultados indican que los mAbs de Conf IV y Conf V reconocen epítipos que pueden solapar con los sitios de unión del receptor de conformación en la proteína S, aunque estos mAbs no compiten entre sí en los ensayos de competencia de unión. Los mAbs de Conf III y dos mAbs de Conf VI (19B2 y 45F6) pueden unirse igualmente a los epítipos de conformación que están implicados en la unión del receptor. Todos los mAbs de Conf I y de Conf II no bloquean la unión del receptor, lo cual sugiere que reconocen los epítipos de conformación que no solapan los sitios de unión del receptor en RBD. Estos resultados aclaran la heterogeneidad epitépica de los mAbs específicos de RBD y además indican que el RBD de la proteína S contiene múltiples conformaciones congénitas.

35 *Los mAbs específicos de RBD tienen potente actividad neutralizante.* Cada uno de los mAbs específicos de RBD se ensayó para determinar la actividad neutralizante contra el pseudovirus SARS. De manera sorprendente, la mayoría de los mAbs dependiente de la conformación (23/25) tenían potente actividad neutralizante con dosis de neutralización al 50% (ND₅₀) dentro del intervalo de desde 0,005 hasta 6,569 µg/ml (Tabla III), en tanto que dos mAbs que dirigen contra epítipos lineales (4D5 y 17H9) y un mAb procedente de Conf VI (44B5) a una concentración tan alta como de 100 µg/ml no neutralizaron la infección por pseudovirus SARS. Los mAbs 33G4 procedentes de Conf V y 30F9 procedentes de Conf IV, que bloquearon la unión del receptor tenían actividades neutralizantes las más altas contra el pseudovirus. De manera interesante, incluso 45F6 procedente de Conf VI, con su actividad neutralizante del pseudovirus relativamente más baja, bloqueó parcialmente la unión de RBD-Fc con ACE2. En la Fig. 3, se presenta la actividad neutralizante dependiente de la dosis de diversos mAbs representativos procedentes de cada uno de los grupos. Estos resultados sugieren que el RBD de la proteína S induce de manera predominante los anticuerpos neutralizantes que dirigen contra los epítipos de conformación.

Exposición experimental

50 Recientes estudios han mostrado que la proteína S del SARS-CoV es uno de los antígenos principales que provocan respuestas inmunes durante la infección (44-46). Esto sugiere que la proteína S puede servir como inmunógeno para la inducción de mAbs neutralizantes. En el presente estudio, los autores de la presente invención han usado una proteína de fusión recombinante RBD-Fc como un inmunógeno para inmunizar ratones y generaron clones de hibridoma para producir 27 mAbs. Una mayoría de estos mAbs (25/27) reconocieron epítipos de conformación y entre ellos, 23 mAbs tenían potente actividad neutralizante. Únicamente dos mAbs se maparon a los epítipos lineales adyacentes mediante péptidos de solapamiento y no pudieron neutralizar la infección por pseudovirus SARS. De manera interesante, los mAbs dependientes de la conformación pudieron dividirse en seis grupos diferentes (es decir, Conf I-VI) en base a un experimento de competencia de unión, lo que sugiere que existen diversos epítipos de distinta conformación sobre el RBD que pueden provocar anticuerpos neutralizantes.

60 Sería de esperar que todos los mAbs neutralizantes dirigidos contra el RBD pudieran bloquear la interacción entre RBD y ACE2, el receptor funcional del SARS-CoV. Sin embargo, los autores de la presente invención han encontrado que únicamente los mAbs que reconocen el Conf IV y V pudieron bloquear de manera eficaz la unión de RBD a

ACE2. Algunos mAbs que reaccionan con Conf III y VI inhibieron parcialmente la interacción entre el RBD y ACE2. Esto sugiere que sus epítomos pueden solapar los sitios de unión del receptor sobre el RBD o la unión de estos mAbs a RBD puede causar cambios de conformación de los sitios de unión del receptor, dando como resultado la inhibición de la unión de RBD a ACE2. Los mAbs que reconocen los Conf I y II no afectan de manera significativa a la unión de RBD a ACE2, pero igualmente poseen potentes actividades neutralizantes, lo que sugiere que estos mAbs inhiben la infección de SARS-CoV sin interferir la interacción de RBD-ACE2. El mecanismo de acción de estos mAbs necesita investigarse más. Esos datos indican que el RBD induce anticuerpos neutralizantes específicos no solamente para los sitios de unión del receptor, sino además para otras conformaciones estructurales únicas, a la vista de su heterogenicidad antigénica, y sugieren que el RBD de la proteína S de SARS-CoV contiene múltiples epítomos de conformación responsables de la inducción de potentes respuestas de anticuerpos neutralizantes.

La sensibilidad de conformación de los mAbs neutralizantes de SARS-CoV descrita en la presente invención está de acuerdo con las propiedades de los mAbs neutralizantes generados contra otros virus envueltos, lo cual generalmente requiere mayor conformación nativa para la unión (47,48). Aunque el RBD de la proteína S de SARS-CoV es un fragmento pequeño de 193 aminoácidos, este contiene siete cisteínas y cinco de las cuales son esenciales para la asociación de ACE2. Los enlaces disulfuro entre estas cisteínas puede formar estructuras terciarias complejas para constituir las múltiples conformaciones antigénicas. Sin embargo, un mAb humano neutralizante seleccionado a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos no inmunes podría reaccionar con la proteína S reducida con DTT y bloquear la asociación del receptor (49). Por ello, es necesaria la caracterización adicional para definir los determinantes de neutralización sobre el RBD de la proteína S de SARS-CoV, y esto puede proporcionar información crítica para el desarrollo de productos farmacéuticos y vacunas anti-SARS.

Se ha informado que la transferencia pasiva de sueros inmunes de ratón redujeron la replicación vírica pulmonar en los ratones expuestos con SARS-CoV (33,50), y la administración profiláctica de mAbs neutralizantes confirió protección *in vivo* en los ratones o en los hurones (51,52), lo que sugiere que la inmunización pasiva con anticuerpos anti-SARS es una estrategia viable para el control del SARS. Así, pueden usarse mAbs con altos índices de actividad neutralizante del SARS-CoV para el tratamiento temprano de la infección por SARS-CoV. Sin embargo, la aplicación de mAbs murinos en humanos estará limitada debido a las respuestas anticuerpo anti-ratón-humano (HAMA) (53-55). Si únicamente se usan unas pocas dosis de mAbs murinos en un corto período de tiempo (una o dos semanas) en la fase temprana de la infección por SARS-CoV, puede no causar una seria respuesta HAMA, pero este tratamiento urgente puede salvar vidas de pacientes con SARS. Los autores de la presente invención han usado estrategias similares para el tratamiento temprano de la infección por el virus Hantaan (HTNV), usando mAbs anti-HTNV murinos (56). Además, los mAbs neutralizantes murinos pueden humanizarse como productos terapéuticos o para inmunoprofilaxis para proporcionar protección inmediata contra la infección por SARS-CoV a aquellas poblaciones en riesgo.

La importancia del presente estudio es triple. En primer lugar, se han generado un cierto número de mAbs neutralizantes específicos del RBD altamente potentes, los cuales pueden desarrollarse como productos inmunoterapéuticos para el tratamiento urgente contra el SARS. En segundo lugar, estos mAbs pueden desarrollarse como agentes de diagnóstico para la detección de la infección por SARS-CoV. En tercer lugar, estos mAbs pueden usarse como sondas para el estudio de la inmunoespecificidad, antigenicidad, estructura, y función de la proteína S del SARS-CoV. Estos mAbs pueden además humanizarse para el tratamiento y la prevención del SARS.

Tabla I. Reactividades de mAbs específicos del RBD contra diversos antígenos^a

mAbs	Isotipo	Antígeno				
		RBD-Fc	RBD-Fc reducido	S1-C9	S1-C9 reducido	IgG humano
4D5	IgG1/k	0,88	1,36	0,65	0,94	0,02
9F7	IgG1/k	1,60	0,00	1,45	0,08	0,04
10E7	IgG1/k	1,77	0,02	1,72	0,16	0,05
11E12	IgG2a/k	1,50	0,01	0,72	0,09	0,02
12B11	IgG1/k	1,37	0,04	0,78	0,00	-0,01
13B6	IgG1/k	1,58	-0,01	0,93	0,00	0,02
17H9	IgG1/k	1,72	1,71	1,21	1,15	0,07
18C2	IgG1/k	1,28	-0,01	0,80	0,01	-0,20
18D9	IgG1/k	1,47	-0,01	0,90	0,01	0,03

Tabla I. (Cont.)

mAbs	Isotipo	Antígeno				
		RBD-Fc	RBD-Fc reducido	S1-C9	S1-C9 reducido	IgG humano
19B2	IgG1/κ	1,63	0,00	1,55	0,12	0,01
20E7	IgG2a/κ	1,50	0,00	0,98	0,01	0,02
24F4	IgG1/κ	1,69	-0,01	1,08	0,08	0,04
24H8	IgG1/κ	1,54	-0,01	0,94	0,12	0,01
26A4	IgG1/κ	1,60	0,00	0,89	0,09	0,01
26E1	IgG1/κ	1,91	0,07	1,85	0,06	0,01
27C1	IgG1/κ	1,46	0,00	1,57	0,07	0,01
28D6	IgG1/κ	2,06	0,01	1,60	0,16	0,00
29G2	IgG2a/κ	1,69	0,00	0,96	0,17	0,04
30F9	IgG1/κ	1,66	0,04	1,21	0,12	0,01
31H12	IgG1/κ	1,72	0,08	1,91	0,22	0,03
32H5	IgG1/κ	1,54	0,06	1,55	0,51	0,00
33G4	IgG2a/κ	1,79	0,02	1,76	0,20	-0,01
34E10	IgG1/κ	1,62	0,10	1,82	0,18	0,04
35B5	IgG1/κ	1,74	0,06	1,72	0,25	0,02
38D4	IgG1/κ	1,63	-0,01	1,20	0,07	0,00
44B5	IgG1/κ	1,57	0,09	1,64	0,16	0,00
45F6	IgG2a/κ	1,61	0,11	1,43	0,15	-0,01
Antisuero		2,22	1,78	2,32	1,68	2,07
Suero natural		0,01	0,02	0,02	0,01	0,04

^a Se usaron antígenos a una concentración de 1 µg/ml; los mAbs se ensayaron a una concentración de 10 µg/ml y los sueros se ensayaron a una dilución de 1:100. Las reactividades positivas se resaltan en negrilla.

Tabla II. % de inhibición de mAbs específicos del RBD sobre la unión de mAbs biotinilados a RBD-Fc^a

Grupo	mAb de competencia	mAb biotinilados				
		10E7	11E12	33G4	45B5	17H9
Conf I	9F7	84,5	11,7	-13,3	22,3	16,4
	10E7	91,0	5,6	-12,9	21,0	9,9
	12B11	85,8	19,3	-0,2	19,8	21,0
	18C2	84,9	19,3	4,9	18,1	19,4
	24H8	93,7	24,0	7,0	25,6	22,1
	26E1	95,1	10,5	37,4	30,4	25,0
	29G2	96,6	20,4	1,6	11,4	23,4

Tabla II. (Cont.)

Grupo	mAb de competencia		mAb biotinilados				
			10E7	11E12	33G4	45B5	17H9
	32H5		98,9	18,5	4,4	9,1	20,3
Conf II	20E7		97,2	38,5	5,9	73,0	24,6
	26A4		96,3	33,1	-0,5	60,0	19,0
	27C1		97,2	36,7	14,6	73,7	20,9
	31H12		97,5	18,7	7,1	58,4	19,7
	30E10		98,3	19,3	12,9	68,9	24,6
Conf III	11E12	12,6	92,0	0,3	-3,7		20,2
	18D9	-16,2	98,3	8,3	23,6		17,1
Conf IV	28D6	39,7	99,6	13,8	67,4		26,6
	30F9	28,7	100,0	8,7	64,0		32,4
	35B5	34,9	99,9	10,0	64,7		33,6
Conf V	24F4	11,5	-1,0	95,5	2,5		24,9
	33G4	9,5	-3,7	99,5	26,4		29,1
	38D4	8,1	-14,4	82,0	-5,1		15,8
Conf VI	13B6	23,3	10,7	-4,9	72,5		12,6
	19B2	2,9	-26,4	18,0	50,0		16,1
	44B5	25,3	-20,6	10,0	95,6		19,4
	45F6	25,7	-10,4	10,8	94,8		23,5
Lineal	4D5	13,0	10,6	-11,1	1,0		-10,5
	17H9	17,8	33,3	-5,8	25,0		97,8

Los mAbs de competencia se ensayaron a una concentración de 100 µg/ml para determinar la capacidad para bloquear la unión de los mAbs biotinilados al RBD-Fc en un ensayo ELISA. Una inhibición mayor del 40% se consideró competencia positiva (valores en negrilla). Los números negativos indican el incremento de unión del reactivo biotinilado.

ES 2 384 497 T3

Tabla III. Neutralización de la actividad de mAbs específicos de RDB-Fc contra pseudovirus SARS

Grupo	mAb	Inhibición de la unión a ACE2 ^a	ND ₅₀ (µg/ml)
Conf I	9F7	-	6,569
	10E7	-	1,673
	12B11	-	4,918
	18C2	-	5,031
	24H8	-	3,955
	26E1	-	0,354
	29G2	-	3,02
	32H5	-	0,275
Conf II	20E7	-	5,959
	26A4	-	2,815
	27C1	-	1,607
	31H12	-	0,139
	30E10	-	0,399
Conf III	11E12	+	1,39
	18D9	+	0,02
Conf IV	28D6	++	0,298
	30F9	++	0,009
	35B5	++	0,131
Conf V	24F4	++	0,052
	33G4	++	0,005
	38D4	++	0,332
Conf VI	13B6	-	1,436
	19B2	+	0,936
	44B5	-	>100
	45F6	+	43,894
Lineal	4D5	-	>100

	17H9	-	>100
--	------	---	------

Tabla III. (Cont.)

^a “-”, “+”, y “++” indican no inhibición, parcial, y completa, respectivamente.
--

Referencias

- 5 1. Drosten, C., S. Gunther, W. Preiser, W.S. Var Der, H.R. Brodt, S. Becker, H. Rabenau, M. Panning, L. Kolesnikova, RA. Fouchier, A. Berger, A.M. Burguiere, J. Cinati, M. Eickmann, N. Escriou, K. Grywna, S. Kramme, J.C. Manuguerra, S. Muller, V. Rickerts, M. Sturmer, S. Vieth, H.D. Kienk, A.D. Osterhaus, H. Schmitz, y H.W. Doerr. “Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome”, N. Engl. J. Med., vol. 348, págs. 1967-1976, (2003).
- 10 2. Ksiazek, T.G., D. Erdman, C.S. Goldsmith, S.R. Zaki, T. Peret, S. Emery, S. Tong, C. Urbani, J.A. Comer, W. Lim, P.E. Rollin, S.F. Dowell, A.E. Ling, C.D. Humphrey, W.J. Sieh, J. Guarner, C.D. Paddock, P. Rota, B. Fields, J. DeRisi, J.Y. Yang, N. Cox, J.M. Hughes, J.W. LeDuc, W.J. Bellini, y L.J. Anderson. “A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome”, N. Engl. J. Med., vol. 348, págs. 1953-1966, (2003).
- 15 3. Peiris, J.S., S.T. Lai, L.L. Poon, Y. Guan, L.Y. Yam, W. Lim, J. Nicholls, W.K. Yee, W.W. Yan, M.T. Cheung, V.C. Cheng, K.H. Chan, D.N. Tsang, R.W. Yung, T.K. Ng, y K.Y. Yuen. “Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome”. Lancet, vol. 361, págs. 1319-1325, (2003).
- 20 4. Marra, M.A., S.J.M. Jones, C.R. Astell, R.A. Holt, A. Brooks-Wilson, Y.S.N. Butterfield, J. Khattra, J.K. Asano, S.A. Barber, S.Y. Chan, A. Cloutier, S.M. Coughlin, D. Freeman, N. Gim, O.L. Griffith, S.R. Leach, M. Mayo, H. McDonald, S.B. Montgomery, P.K. Pandoh, A.S. Petrescu, A.G. Robertson, J.E. Schein, A. Siddiqui, D.E. Smailus, J.M. Stott, G.S. Yang, F. Plummer, A. Andonov, H. Artsob, N. Bastien, K. Bernard, T.F. Booth, D. Bowness, M. Czub, M. Drebot, L. Fernando, R. Flick, M. Garbutt, M. Gray, A. Grolla, S. Jones, H. Feldmann, A. Meyers, A. Kabani, Y. Li, S. Normand, U. Stroher, G.A. Tipples, S. Tyler, R. Vogrig, D. Ward, B. Watson, R.C. Brunham, M. Kradjin, M. Petric, D.M. Skowroski, C. Upton, y R.L. Roper. “The genome sequence of the SARS-associated coronavirus”. Science, vol. 300, págs. 1399-1404, (2003).
- 25 5. Rota, P.A., M.S. Oberste, S.S. Monroe, W.A. Nix, R. Campagnoli, J.P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M.H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J.L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D.D. Erdman, T.C.Y. Peret, C. Burns, T.G. Ksiazek, P.E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Gunther, A.D.M.E. Osterhaus, C. Drosten, M.A. Pallansch, L.J. Anderson, y W.J. Bellini. “Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome”. Science, vol. 300, págs. 1394-1399, (2003).
- 30 6. Fleck, F. “SARS virus returns to China as scientific race to find effective vaccine”. Bull. World Health Organ., vol. 82, págs. 152-153, (2004).
7. Marshall, E. y M. Enserink. “Medicine. Caution urged on SARS vaccines”. Science, vol. 303, págs. 944-946, (2004).
- 35 8. Peiris, J.S., Y. Guan, y K.Y. Yuen. “Severe acute respiratory syndrome”. Nat. Med., vol. 10, págs. S88-597, (2004).
9. Quin, E., Q. Zhu, M. Yu, B. Fan, G. Chang, B. Si, B. Yang, W. Peng, T. Jiang, B. Liu, Y. Deng, H. Liu, Y. Zhang, C. Wang, Y. Li, Y. Gan, X. Li, F. Lu, G. Tan, W. Cao, R. Yang, J. Wang, W. Li, Z. Xu, Y. Li, Q. Wu, W. Lin, Y. Han, G. Li, W. Li, H. Lu, J. Shi, Z. Tong, F. Zhang, S. Li, B. Liu, S. Liu, W. Dong, J. Wang, G.K.S. Wong, J. Yu, y H. Yang. “A complete sequence and comparative analysis of a SARS-associated virus (isolate BJ01)”. Chin. Sci. Bull., vol. 48, págs. 941-948, (2003).
- 40 10. Holmes, K.V. y L. Enjuanes. “The SARS coronavirus: a postgenomic era”. Science, vol. 300, págs. 1377-1378, (2003).
11. Holmes, K.V. “SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy”. J. Clin. Invest., vol. 111, págs. 1605-1609, (2003).
- 45 12. Frana, M.F., J.N. Behnke, L.S. Sturman, y K.V. Holmes. “Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of immune coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion”. J. Virol., vol. 56, págs. 912-920, (1985).

13. Luytjes, W., L.S. Sturman, P.J. Bredenbeek, J. Charlie, B.A. van der Zeijst, M.C. Horzinek, y W.J. Spaan, "Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site". *Virology*, vol. 161, págs. 479-487, (1987).
- 5 14. Spiga, O., A. Bernini, A. Ciutti, S. Chiellini, N. Menciassi, F. Finetti, V. Causarano, F. Anselmi, F. Prischi, y N. Niccolai. "Molecular modelling of S1 and S2 subunits of SARS coronavirus spike glycoprotein". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 310, pág. 84, (2003).
15. Bosch, B.J., B.E. Martina, Z.R. Van Der, J.Lepault, B.J. Haijema, C. Versluis, A.J. Heck, R De Groot, A.D. Osterhaus, y P.J. Rottier. "Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, págs. 8455-8460, (2004).
- 10 16. Ingallinella, P., E. Bianchi, M. Finotto, G. Cantoni, D.M. Eckert, V.M. Supekar, C. Brickmann, A. Carfi, y A. Pessi. "Structural characterization of the fusion-active complex of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, págs. 8709-8714, (2004).
- 15 17. Liu, S., G. Xiao, Y. Chen, Y. He, J. Niu, C. Escalante, H. Xiong, J. Fammar, A.K. Debnath, P. Tien, y S. Jiang. "Interaction between the heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implication for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors". *Lancet*, vol. 363, págs. 938-947, (2004).
18. Tripet, B., M.W. Howard, M. Jobling, R.K. Holmes, y R.S. Hodges. "Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core". *J. Biol. Chem.*, vol. 279, págs. 20836-20849, (2004).
19. Chan, D.C., D. Fass, J.M. Berger, y P.S. Kim. "Core structure of gp4 from the HIV envelope glycoprotein". *Cell*, vol. 89, págs. 263-273, (1997).
- 20 20. Bosch, B.J., Z.R. van der, C.A. de Haan, y P.J. Rottier. "The coronavirus spike protein as a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the core complex". *J. Virol.*, vol. 77, págs. 8801-8811, (2003).
21. Xu, Y., Z. Lou, Y. Liu, H. Pang, P. Tien, G.F. Gao, y Z. Rao. "Crystal structure of SARS-CoV spike protein fusion core". *J. Biol. Chem.*, vol. 279, págs. 49414-49419, (2004).
- 25 22. Li, W.H., M.J. Moore, N.Y. Vasilieva, J.H. Sui, S.K. Wong, A.M. Berne, M. Somasundaran, J.L. Sullivan, K. Luzuriaga, T.C. Greenough, H.Y. Choe, y M. Farzan. "Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus". *Nature*, vol. 426, págs. 450-454, (2003).
23. Dimitrov, D.S. "The secret of ACE2 as a receptor of the SARS Virus". *Cell*, vol. 115, págs. 652-653, (2003).
24. Prabakaran, P., X. Xiao, y D.S. Dimitrov. "A model of the ACE2 structure and function as a SARS-CoV receptor". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 314, págs. 235-241, (2004).
- 30 25. Wang, P., Chan, A. Zheng, Y. Nie, X. Shi, W. Wang, G. Wang, M. Luo, H. Liu, L. Tan, X. Song, Z. Wang, X. Yin, X. Qu, X. Wang, T. Qing, M. Ding, y H. Deng. "Expression cloning of functional receptor used by SARS coronavirus". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 315, págs. 439-444, (2004).
26. Xiao, X., Chakraborti, A.S. Dimitrov, K. Gramatikoff, y D.S. Dimitrov. "The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 312, págs. 1159-1164, (2003).
- 35 27. Wong, S.K., W. Li, M.J. Moore, H. Choe, y M. Farzan. "A 193-amino-acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2". *J. Biol. Chem.*, vol. 279, págs. 3197-3201, (2004).
28. Babcock, G.J., D.J. Eshshaki, W.D. Thomas, Jr., y D.M. Ambrosino. "Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor". *J. Virol.*, vol. 78, págs. 4552-4560, (2004).
- 40 29. Cavanagh, D. "The coronavirus surface glycoprotein. In *The Coronaviridae*". S.G. Siddell, editor. Plenum Press, New York and London, págs. 73-114, (1995).
30. Saif, L.J. "Coronavirus immunogens". *Vet. Microbiol.*, vol. 37, págs. 285-297, (1993).
31. Buchholz, U.J., Bukreyev, L. Yang, E.W. Lamirande, B.R. Murphy, K. Subbarao, y P.L. Collins. "Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, págs. 9804-9809, (2004).
- 45 32. Yang, Z.Y., W.P. Kong, Y. Huang, A. Roberts, B.R. Murphy, K. Subbarao, y G.J. Nabel. "A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice". *Nature*, vol. 428, págs. 561-564, (2004).
33. Bisht, H., A. Robererts, L. Vogel, A. Bukreyev, P.L. Collins, B.R. Murphy, K. Subbarao, y B. Moss. "Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, págs. 6641-6646, (2004).
- 50

34. Bukreyev, A., E.W. Lamirande, U.J. Buchholz, L.N. Vogel, W.R. Elkins, M. St Claire, B.R. Murphy, K. Subbarao, y P.L. Collins. "Mucosal immunisation of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS". Lancet, vol. 363, págs. 2122-2127, (2004).
- 5 35. He, Y., Y. Zhou, S.Liu, Z. Kou, W. Li, M. Farzan, y S. Jiang. "Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine". Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 324, págs. 773-781, (2004).
36. He, Y., Y. Zhou, P. Siddiqui, y S. Jiang. "Inactivated SARS-CoV vaccine elicits high titers of spike protein-specific antibodies that block receptor binding and virus entry". Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 325, págs. 445-452, (2004).
- 10 37. Morrison, S.L., M.J. Johnson, L.A. Herzenberg, y V.T. Oi. "Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81, págs. 6851-6855, (1984).
38. Boulianne, G.L., N. Hozumi, y M.J. Shulman. "Production of functional chimaeric mouse/human antibody". Nature, vol. 312, págs. 643-646, (1984).
- 15 39. Nisihara, T., Y. Ushio, H. Higuchi, N. Kayagaki, N. Yamaguchi, K. Soejima, S. Matsuo, H. Maeda, Y. Eda, K. Okumura, y H. Yagita. "Humanization and epitope mapping of neutralizing anti-human Fas ligand monoclonal antibodies: structural insights into Fas/Fas ligand interaction". J. Immunol., vol. 167, págs. 3266-3275, (2001).
40. Winter, G. y C. Milstein. "Man-made antibodies". Nature, vol. 349, págs. 293-299, (1991).
41. Foote, J. y G. Winter. "Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops". J. Mol. Biol., vol. 224, págs. 487-499, (1992).
- 20 42. Zhang, H., G. Wang, J. Li, Y. Nie, X. Shi, G. Lian, W. Wang, X. Yin, Y. Zhao, X. Qu, M. Ding, y H. Deng. "Identification of an antigenic determinant on the S2 domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein capable of inducing neutralizing antibodies". J. Virol., vol. 78, págs. 6939-6945, (2004).
43. Nie, Y., G. Wang, X. Shi, H. Zhang, Y. Qiu, Z. He, W. Wang, G. Lian, X. Yin, L. Du, L. Ren, J. Wang, X. He, T.Li, H. Deng, y M. Ding. "Neutralizing antibodies in patients with severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection". J. Infect. Dis., vol. 190, págs. 1119-1126, (2004).
- 25 44. Hofmann, H., K. Hattermann, a. Marzi, T. Gramberg, M. Geier, M. Krumbiegel, S. Kuate, K. Uberla, M. Niedrig, y S. Pohlmann. "S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients". J. Virol., vol 78, págs. 6134-6142, (2004).
- 30 45. Lu, L., I. Manopo, B.P. Leung, H.H. Chng, A.E. Ling, L.L. Chee, E.E. Ooi, S.W. Chan, y J. Kwang. "Immunological characterization of the spike protein of the severe acute respiratory syndrome coronavirus". J. Clin. Microbiol., vol. 42, págs. 1570-1576, (2004).
46. He., Y., Y. Zhou, H. Wu, B. Luo, J. Chen, W. Li, y S. Jiang. "Identification of immunodominant sites on the spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: implication for developing SARS diagnostics and vaccines". J. Immunol., vol. 173, págs. 4050-4057, (2004).
- 35 47. Wilson, J.A., M. Hevey, R. Bakken, S. Guest, M. Bray, A.L.Schmaljohn, y M.K. Hart. "Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus". Science, vol. 287, págs. 1664-1666, (2000).
48. Zwick, M.B., L.L. Bonnycastle, A. Menendez, M.B. Irving, C.F. Barbas, III, P.W. Parren, D.R. Burton, y J.K. Scott. "Identification and characterization of a peptide that specifically binds the human, broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody b12". J. Virol., vol. 75, págs. 6692-6699, (2001).
- 40 49. Sui, J., W. Li, A. Murakami, A. Tamin, L.J. Matthews, S.K. Wong, M.J. Moore, A.S. Tallarico, M. Olurinde, H.Choe, L.J. Anderson, W.J. Bellini, M. Farzan y W.A. Marasco. "Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 101, págs. 2536-2541, (2004).
- 45 50. Subbarao, K., J. McAuliffe, L. Vogel, G. Fahle, S. Fischer, K. Tatti, M. Packard, W.J. Shieh, S. Zaki, y B. Murphy. "Prior infection and passive transfer of neutralizing antibody prevent replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in the respiratory tract of mice". J. Virol., vol. 78, págs. 3572-3577, (2004).
51. ter Meulen, J., A.B.H. Bakker, E.N. van der Brink, G.J. Weverling, B.E.E. Martina, B.L. Haagmans, T. Kuiken, J. de Kruijff, W. Preiser, W. Spaan, H.R. Gelderbloem, J. Goudmit, y A.D.M.E. Osterhaus. "Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets". Lancet, vol. 363, págs. 2139-2141, (2004).
- 50

52. Tragiai, E., S. Becker, K. Subbarao, L. Kolesnikova, Y. Uematsu, M.R. Gismondo, B.R. Murphy, R. Rappuoli, y A. Lanzavecchia. "An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus". Nat. Med., vol. 10, págs. 871-875, (2004).

5 53. Welt, S., C.R. Divgi, F.X. Real, S.D. Yeh, P. Garin-Chesa, C.L. Finstad, J. Sakamoto, A. Cohen, E.R. Sigurdson, N. Kemeny, "Quantitative analysis of antibody localization in human metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody A33". J. Clin. Oncol., vol. 8, págs. 1894-1906, (1990).

54. Welt. S. y G. Ritter. "Antibodies in the therapy of colon cancer". Semin. Oncol., vol. 26, págs. 683-690, (1999).

55. Breedveld, F.C. "Therapeutic monoclonal antibodies". Lancet, vol. 355, págs. 735-740, (2000).

10 56. Xu, Z.K., L.X. Wei, L.Y. Wang, H.T. Wang, y S. Jiang. "The in vitro and in vivo protective activity of monoclonal antibodies directed against Hantaan virus: potential application for immunotherapy and passive immunization". Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 298, págs. 552-558, ((2002).

La invención (no de acuerdo con la invención) puede definirse de acuerdo con los aspectos 1 a 36 a continuación.

15 1. Un anticuerpo aislado capaz de unión al dominio de unión del receptor de la proteína espicular del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) o anticuerpo capaz de inhibir de manera competitiva la unión del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) a un receptor sobre las células huéspedes o a un receptor libre de células.

2. Una sustancia que comprende las regiones determinantes complementarias del anticuerpo del aspecto 1, capaces de unión al mismo epítipo o de inhibir de manera competitiva dicho epítipo como el anticuerpo del aspecto 1.

3. La sustancia del aspecto 2, en el que la sustancia es un anticuerpo.

20 4. El anticuerpo del aspecto 1, en el que el anticuerpo es neutralizante.

5. Un anticuerpo producido por el hibridoma 18D9 con el No. de Acceso de ATCC PTA-6521.

6. El epítipo reconocido por el anticuerpo del aspecto 5.

7. Un anticuerpo producido por el hibridoma 19B2 con el No. de Acceso de ATCC PTA-6522.

8. El epítipo reconocido por el anticuerpo del aspecto 7.

25 9. Un anticuerpo producido por el hibridoma 30F9 con el No. de Acceso de ATCC PTA-6523.

10. El epítipo reconocido por el anticuerpo del aspecto 9.

11. Un anticuerpo producido por el hibridoma 31H12 con el No. de Acceso de ATCC PTA-6524.

12. El epítipo reconocido por el anticuerpo del aspecto 11.

13. Un anticuerpo producido por el hibridoma 32H5 con el No. de Acceso de ATCC PTA-6525.

30 14. El epítipo reconocido por el anticuerpo del aspecto 13.

15. Un anticuerpo producido por el hibridoma 33G4 con el No. de Acceso de ATCC PTA-6526.

16. El epítipo reconocido por el anticuerpo del aspecto 15.

17. El anticuerpo del aspecto 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla o un constructo de fusión de anticuerpo.

35 18. El epítipo del aspecto 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

19. El epítipo del aspecto 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

20. El anticuerpo aislado del aspecto 1, en el que el anticuerpo está acoplado directamente o indirectamente a un agente citotóxico.

21. Una célula que comprende el anticuerpo del aspecto 1.

40 22. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo del aspecto 1.

23. Una molécula de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente la molécula del aspecto 22.

24. La molécula de ácido nucleico del aspecto 22, en la que es ADN sintético, ADN genómico, ADNc, o ARN.

25. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico del aspecto 24 o una porción de la misma.
26. Una célula que comprende la molécula de ácido nucleico del aspecto 24.
27. Un procedimiento para la producción de un anticuerpo capaz de unión al dominio de unión del receptor de la proteína espicular del rotavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) o un anticuerpo capaz de inhibir de manera competitiva la unión del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) a células huésped, que comprende el ligado de manera operativa de la molécula de ácido nucleico del aspecto 22 al elemento regulador apropiado con el fin de expresar dicho anticuerpo; la disposición de la molécula nucleica ligada en condiciones apropiadas que permitan la expresión de dicho anticuerpo; y la recuperación de dicho anticuerpo expresado, produciendo, de esta forma, dicho anticuerpo.
28. El anticuerpo producido mediante el procedimiento del aspecto 27.
29. Una composición que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo del aspecto 1 y un vehículo adecuado.
30. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo del aspecto 1 y un vehículo aceptable farmacéuticamente.
31. Un procedimiento para el tratamiento por infección del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), que comprende el uso de la composición farmacéutica del aspecto 30.
32. Un procedimiento de prevención de infección del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), que comprende el uso de la composición farmacéutica del aspecto 30.
33. Un procedimiento para la detección del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) o de células infectadas por el SARS-CoV, que comprende la puesta en contacto del anticuerpo o sus derivados capaces de unión al dominio de unión del receptor de la proteína espicular de dicho virus bajo condiciones que permitan la formación de complejos entre el anticuerpo, o su derivado, y el dominio de unión del receptor de la proteína espicular del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV); y la detección del complejo formado.
34. Un procedimiento para el rastreo de compuestos capaces de inhibir la infección del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo mediante el bloqueo de la unión de dicho virus a receptores sobre células huéspedes, que comprende las etapas de:
- (a) establecer un sistema para el anticuerpo del aspecto 1 para unir al dominio de unión del receptor de la proteína espicular del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), y
 - (b) poner en contacto los compuestos con el sistema de (a), indicando una disminución en la unión del anticuerpo del aspecto 1 al dominio de unión del receptor de la proteína espicular del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) que los compuestos son capaces de interferir con dicha unión e inhibir la infección del receptor de la proteína espicular del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV).
35. El compuesto que resulta del procedimiento del aspecto 34.
36. Un kit que comprende un compartimento que contiene el anticuerpo del aspecto 1.

Listado de secuencias

- <110> Jiang, Shibo
He, Yuxian
- <120> Anticuerpos monoclonales neutralizantes contra el coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo
- <130> 1958427-00011
- <140> 11/351.108
<141> 28-02-2006

<150> US 11/141.925

<151> 31-05-2005

5 <150> US 60/651.046

<151> 28-02-2005

<150> US 60/576.118

<151> 02-06-2004

10

<160> 4

<170> Patentin versión 3.3

<210> 1

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Coronavirus humano

<400> 1

Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu Arg Pro
1 5 10 15

Phe

20 <210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Coronavirus humano

<400> 2

Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn
1 5 10 15

25 val

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Coronavirus humano

30 <400> 3

ES 2 384 497 T3

Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly
1 5 10 15

Lys

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Coronavirus humano

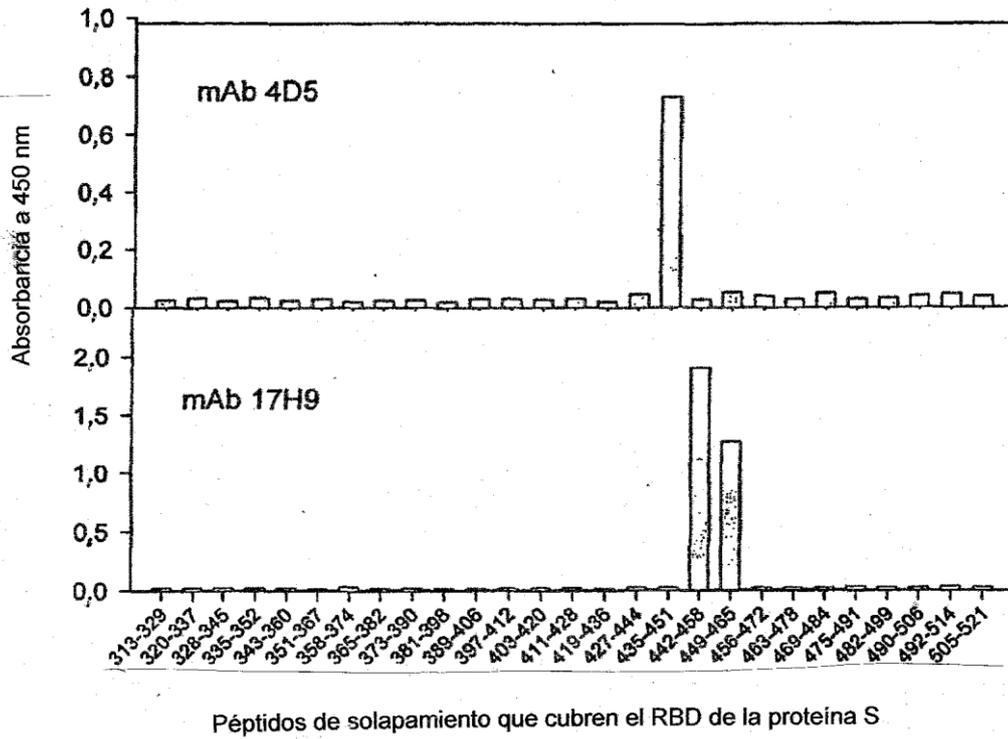
<400> 4

Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal neutralizante aislado capaz de unión al dominio de unión del receptor de la proteína espicular del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), en el que el anticuerpo se produce mediante el hibridoma 30F9 con No. de Acceso de ATCC PTA-6523.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo aceptable farmacéuticamente.
3. El hibridoma 30F9 con el No. de Acceso de ATCC PTA-6523.
4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de infección por SARS-CoV.
5. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de infección por SARS-CoV.
- 10 6. Un procedimiento para la detección del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) o de células infectadas con SARS-CoV *in vitro*, que comprende poner en contacto un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 bajo condiciones que permiten la formación de complejos entre el anticuerpo y el dominio de unión del receptor de la proteína espicular del SARS-CoV, y la detección de los complejos formados.
- 15 7. Un procedimiento para el rastreo de compuestos capaces de inhibir la infección por el coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) mediante el bloqueo de la unión del virus a receptores sobre células huéspedes, que comprende las etapas de:
 - (a) establecer un sistema para el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 para unir al dominio de unión de la proteína espicular del receptor del SARS-CoV; y
 - (b) poner en contacto un compuesto a rastrear con el sistema de (a), indicando una disminución en la unión del anticuerpo al dominio de unión del receptor de la proteína espicular del SARS-CoV que el compuesto es capaz de interferir con la unión e inhibir la infección del dominio de unión del receptor de la proteína espicular del SARS-CoV.
- 20 8. Un kit de diagnóstico o un kit de rastreo que comprende un compartimento que contiene un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.

Fig. 1



Péptidos de solapamiento que cubren el RBD de la proteína S

Fig. 2

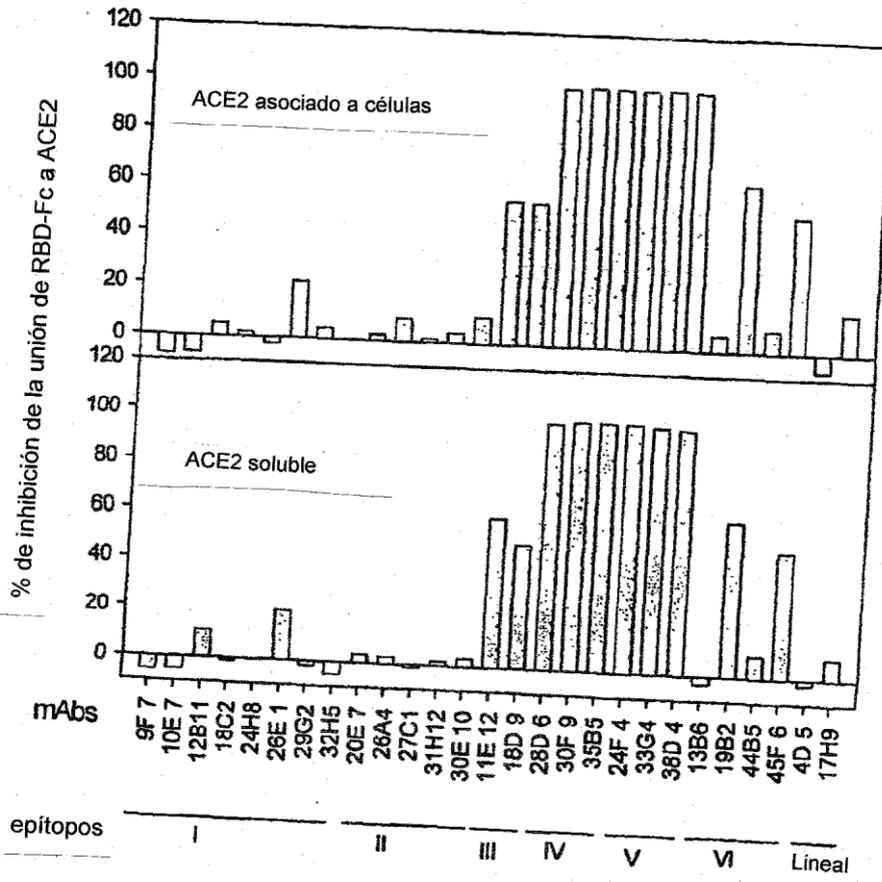


Fig. 3

