

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 774**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2009** **E 09015373 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013** **EP 2332986**

54 Título: **Anticuerpo que se une a parvovirus H-1**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.01.2014

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**LEUCHS, BARBARA;
KÜRSCHNER, KATHRIN;
KERN, ANDREA;
MÜLLER, MARCUS;
MÜNSTERMAN, SILVIA y
ROMMELAERE, JEAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 438 774 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 que se une a parvovirus H-1

5 La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por tanto, se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a una cápsida de parvovirus H-1 llena o vacía, uniéndose dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo sólo a una cápsida de parvovirus H-1 nativa pero no a proteínas de la cápsida de parvovirus H-1 desnaturalizadas. El anticuerpo de la presente invención es útil para diversos métodos diagnósticos y terapéuticos, por ejemplo, para la detección/terapia
10 de una infección por parvovirus H-1.

Parvovirus designa un género de la familia de virus Parvoviridae. El género parvovirus comprende varios virus icosaédricos pequeños que pueden replicarse en ausencia de un virus auxiliar. Parvovirus contiene un ADN monocatenario que tiene una longitud de aproximadamente 5.000 pb. En cada uno de los extremos 3' y 5' del ADN hay una secuencia palíndrica. El ADN codifica para dos proteínas de la cápsida, VP1 y VP2 [figura 1], así como para dos proteínas no estructurales reguladoras, NS-1 y NS-2. Estas últimas proteínas están fosforiladas y muestran localización nuclear o tanto citoplasmática como nuclear, respectivamente. VP3, una tercera proteína de la cápsida, más pequeña, se deriva de VP2 mediante escisión proteolítica. Las dos proteínas de la cápsida VP1 y VP2 están codificadas por marcos de lectura abiertos solapantes de modo que la región que codifica para VP2 está comprendida totalmente dentro de la región que codifica para VP1. En una infección natural, las proteínas de la cápsida se expresan en una razón VP1:VP2 de 1:10 debido a corte y empalme alternativo. Recientemente, se ha mostrado que la región de las proteínas de la cápsida que es específica para VP1 (región N-terminal) contiene motivos comunes a fosfolipasa A celular y de hecho ejerce esta actividad *in vitro*. La PLA₂ secretada, dependiente de calcio con la que VP1 de parvovirus comparte similitudes, toma parte en rutas de señalización que implican lisis celular mediante permeabilización de membranas. Por otro lado, se ha mostrado que NS1 está regulada por miembros de la familia de proteína cinasa C, que a su vez se someten a regulación a través de fosfolipasas.
15
20
25

Los parvovirus habitualmente se toleran bien por las poblaciones de su huésped natural, en el que persisten sin signos patológicos aparentes. Esto se debe tanto a la protección de fetos y recién nacidos por la inmunidad materna, como a la sorprendente restricción de la replicación de parvovirus a un estrecho intervalo de tejidos diana en proliferación en animales adultos. Esta tolerancia del huésped concierne especialmente a parvovirus de roedores, por ejemplo el virus diminuto de ratones (MVM) y el virus H-1 en sus respectivos huéspedes naturales, concretamente ratones y ratas.
30

Además, los seres humanos pueden infectarse con parvovirus, por ejemplo, parvovirus H-1. De hecho, parvovirus es una infección común, que se presenta habitualmente como eritema infeccioso en niños. Es habitualmente leve y autolimitante en personas sanas. Sin embargo, parvovirus también puede provocar artritis reactiva en adultos, y anemia grave en aquéllos con estados hematológicos o inmunocomprometidos. Además, parvovirus afecta a aproximadamente 1 de cada 400 embarazos y puede provocar pérdida del feto o hidropesía fetal. Por tanto, la identificación de la infección por parvovirus, en particular en una mujer embarazada es importante para la monitorización y el posible tratamiento. Desafortunadamente, los métodos actuales para el diagnóstico/terapia de una infección por parvovirus necesitan mejora, por ejemplo, hasta ahora no está disponible un anticuerpo específico contra parvovirus H-1 ensamblado.
35
40

El documento WO 94/10294 A1 se refiere a anticuerpos monoclonales humanos, fragmentos y derivados de los mismos, específicos para parvovirus B19.
45

Raykov *et al.*, *Oncology Reports* 17, págs. 1493-1499 (2007) describen actividades de vacunación y oncolíticas combinadas de parvovirus H-1 en un modelo de tumor metastásico.
50

Maxwell *et al.*, *J. of General Virology*, 74, págs. 1175-1179 (1993) describen la encapsidación del genoma de parvovirus Lulll recombinante por virus H1 y las cepas fibrotrópica y linfotrópica de virus diminuto de ratones.

Por tanto, el problema técnico que subyace a la presente invención es proporcionar un medio mejorado para el diagnóstico y el tratamiento de una infección por parvovirus o una enfermedad asociada con la misma.
55

La solución a dicho problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Tras la inmunización de ratones Balb/c con parvovirus H-1, pudieron aislarse células B que producen anticuerpos del bazo y fusionarse con células de mieloma Ag8 por los inventores. Tras tres rondas de selección usando presión de selección, pudo aislarse la línea celular de hibridoma BL-H1 que produce un anticuerpo monoclonal dirigido contra parvovirus H-1.
60

Por tanto, la presente invención proporciona anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a una cápsida de parvovirus H-1 llena o vacía, uniéndose dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo sólo a una cápsida de parvovirus H-1 nativa pero no a proteínas de la cápsida de parvovirus H-1 desnaturalizadas.
65

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. Se producen fragmentos de unión (a antígeno) mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión química o enzimática de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos de cadena sencilla así como “diacuerpos”. Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo “bienespecífico” o “bifuncional” tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos.

10 El término “cápsida” tal como se usa en el presente documento es el recubrimiento protector de proteína que rodea al ácido nucleico viral que se forma a partir de subunidades proteicas diferentes o idénticas denominadas capsómeros. La cápsida producida a partir de proteínas codificadas por el genoma viral y su conformación sirve como base para la distinción morfológica. Las subunidades proteicas codificadas por los virus se autoensamblarán formando una cápsida, lo que requiere generalmente la presencia del genoma del virus. La cápsida de parvovirus consiste en las proteínas VP1, VP2 y VP3 como parte de la maduración de partículas llenas.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “cápsida llena” se refiere a una cápsida de parvovirus que contiene el ácido nucleico viral, preferiblemente un virus viable. El término “cápsida vacía” se refiere a una cápsida sin ácido nucleico incrustado.

20 El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que se une a una cápsida de parvovirus H-1 nativa pero no a una cápsida desnaturalizada, por ejemplo, una cápsida desnaturalizada mediante el uso de un detergente o calor.

25 En una realización más preferida, el anticuerpo de la presente invención (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) es un anticuerpo neutralizante. Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo neutralizante” significa un anticuerpo que reduce o suprime la actividad biológica del parvovirus, por ejemplo, la replicación y/o infectividad.

30 En una realización incluso más preferida, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a parvovirus H-1 usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de células B humanas y la técnica de hibridoma de VEB (Kohler *et al.*, Nature 256 (1985), 495-7). Puede usarse una cápsula completa, VP1, VP2, VP3 o fragmentos de las mismas para inmunizar un mamífero, tal como un ratón, una rata, un conejo, una cobaya, un mono o un ser humano, para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, el inmunógeno puede conjugarse con una proteína portadora, tal como albúmina sérica bovina, tiroglobulina y hemocianina de lapa californiana. Dependiendo de la especie huésped, pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund, geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio) y sustancias tensioactivas (por ejemplo lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol). Entre los adyuvantes usados en seres humanos, son especialmente útiles BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

45 Pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla usando métodos conocidos en la técnica para producir anticuerpos de cadena sencilla que se unen específicamente a la cápsida e parvovirus H-1. Pueden generarse anticuerpos con especificidad relacionada, pero de composición idiotípica distinta, mediante transposición de cadenas a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas combinatorias al azar [Burton, PNAS USA 88 (1991), 11120-3]. También pueden construirse anticuerpos de cadena sencilla usando un método de amplificación de ADN, tal como PCR, usando ADNc de hibridoma como molde [Thirion *et al.*, Eur.J.Cancer Prev. 5 (1996), 507-11]. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser mono o bienespecíficos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. La construcción de anticuerpos de cadena sencilla tetravalentes, bienespecíficos se enseña, por ejemplo, en Coloma & Morrison, Nat. Biotechnol. 15 (1997), 159-63). La construcción de anticuerpos de cadena sencilla bivalentes, bienespecíficos se enseña en Mallender & Voss, J.Biol.Chem. X no9 (1994), 199-206).

55 En la realización más preferida, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se produce por la línea celular de hibridoma BL-H1 que se ha depositado, según el tratado de Budapest, en la DSMZ con el número DSM ACC3030 el 25 de noviembre de 2009.

60 La presente invención también proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al mismo epítipo que el anticuerpo que se produce por la línea celular de hibridoma BL-H1 que se ha depositado, según el tratado de Budapest, en la DSMZ con el número DSM ACC3030 el 25 de noviembre de 2009.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término “epítipo” incluye cualquier determinante proteico que pueda unirse específicamente a un anticuerpo. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen habitualmente características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo de la invención se une específicamente a un antígeno cuando la constante

de disociación iso $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq \mu\text{M}$ 100 nM y lo más preferiblemente 10 nM. Normalmente, se requieren al menos 6, 8, 10 ó 12 aminoácidos contiguos para formar un epítipo. Sin embargo, epítipos que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo, al menos 15, 25 ó 50 aminoácidos.

5 La presente invención también proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, que compite por la unión a una cápsida de parvovirus H-1 llena o vacía con un anticuerpo de la invención tal como se caracterizó anteriormente.

10 Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo porta un marcador detectable. El anticuerpo/fragmento puede estar marcado de manera detectable directa o indirectamente, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante de metal o una enzima. Los expertos habituales en la técnica conocerán otros marcadores adecuados para la unión al anticuerpo, o podrán determinar tales, usando experimentación de rutina.

15 La presente invención también se refiere a líneas celulares, es decir, líneas celulares que producen un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención. Preferiblemente, esta línea celular es una línea celular de mamíferos. Se conocen bien en la técnica líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión e incluyen cualquier línea celular inmortalizada disponible de la DSMZ o la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), incluyendo células CHO, células NSO, células HeLa, células BHK, células COS, células
20 Hep y varias otras líneas celulares. También pueden usarse células que no son de mamíferos incluyendo bacterianas, de levaduras, de insectos y vegetales para expresar anticuerpos recombinantes. Los métodos de expresión se seleccionan determinando qué sistema genera los niveles de expresión más altos y produce anticuerpos con las propiedades de unión deseadas.

25 Los anticuerpos producidos por tal línea celular pueden purificarse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden purificarse anticuerpos por afinidad mediante paso a lo largo de una columna a la que se une una cápsida de parvovirus, o proteína(s) de la envuelta del parvovirus. Los anticuerpos unidos pueden eluirse entonces de la columna usando un tampón con una alta concentración de sal.

30 La línea celular más preferida es la línea celular de hibridoma BL-H1 que se depositó, según el tratado de Budapest, en la DSMZ con el número ACC3030 el 25 de noviembre de 2009.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica para anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención. Puede construirse un ácido nucleico que
35 codifica para un anticuerpo de la invención, por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla, usando síntesis de nucleótidos manual o automatizada, clonarse en un constructo de expresión usando métodos de ADN recombinante convencionales e introducirse en una célula para expresar la secuencia codificante. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos directamente usando, por ejemplo, tecnología de fagos filamentosos (Verhaar *et al.*, *Int. J. Cancer* 61 (1995), 497-501).

40 La presente invención también proporciona una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención. Tal composición podría ser útil para el diagnóstico de una infección por parvovirus. Además, tal composición puede usarse para

45 (a) la cuantificación de un parvovirus H-1 para preparaciones de parvovirus H-1 y también en pacientes y animales infectados (viremia, farmacocinética), por ejemplo, mediante ELISA;

(b) la detección del ensamblaje y tráfico de parvovirus H-1 en células.

50 (c) La detección de contaminación de parvovirus H-1 en animales de laboratorio, en particular en ratas.

Para el diagnóstico, puede usarse un anticuerpo que se une específicamente a una cápsida de parvovirus H-1 llena o vacía en ensayos inmunoquímicos, tales como inmunotransferencias de tipo Western, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones u otros ensayos inmunoquímicos
55 conocidos en la técnica. Se conocen bien en la técnica numerosos protocolos para ensayos inmunoradiométricos o de unión competitiva. Tales inmunoensayos implican normalmente la medición de la formación de complejos entre el inmunógeno y un anticuerpo que se une específicamente al inmunógeno.

60 El diagnóstico no se limita a un procedimiento de inmunoensayo particular, y por tanto se pretende que incluya procedimientos tanto homogéneos como heterogéneos. Los inmunoensayos a modo de ejemplo que pueden realizarse incluyen inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), inmunoensayo de fluorescencia (FIA), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunoensayo de inhibición nefelométrica (NIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayo (RIA). Un resto indicador, o grupo marcador, pueden unirse a los anticuerpos objeto y se selecciona de modo que cumpla las necesidades de diversos usos del método que están
65 dictadas a menudo por la disponibilidad del equipo de ensayo y procedimientos de inmunoensayo compatibles. Los expertos habituales en la técnica conocen técnicas generales que van a usarse en la realización de los diversos

inmunoensayos indicados anteriormente.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede usarse, por ejemplo, en un método para el tratamiento de una infección por parvovirus H-1 o una enfermedad asociada con la misma, usando la capacidad del anticuerpo para neutralizar el virus (antídoto).

Para la terapia, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos están presentes en una dosis eficaz y se combinan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" quiere decir que abarca cualquier vehículo, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos y que no es tóxico para el paciente al que se le administra. Se conocen bien en la técnica ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles etc. Tales vehículos pueden formularse mediante métodos convencionales.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos según la invención pueden administrarse al sujeto a una dosis eficaz. Una "dosis eficaz" se refiere a cantidades de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son suficientes para afectar al transcurso y la gravedad de la infección/enfermedad, conduciendo a la reducción o remisión de tal patología. Una "dosis eficaz" útil para el tratamiento y/o la prevención de estas infecciones, enfermedades o trastornos puede determinarse usando métodos conocidos por un experto en la técnica (véase por ejemplo, Fingl *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman and Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., Nueva York, págs. 1-46 ((1975)).

Finalmente, la presente invención también proporciona un kit útil para el diagnóstico o la terapia de una infección por parvovirus H-1 o una enfermedad asociada con tal infección que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención. Preferiblemente, el kit comprende un medio de vehículo que está compartimentalizado para alojar en confinamiento estrecho en el mismo uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los medios de recipiente uno de los elementos separados que va a usarse en el ensayo. Por ejemplo, uno de los medios de recipiente puede comprender un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención que está, o puede estar, marcado de manera detectable. El kit también puede tener recipientes que contienen tampón/tampones y/o un recipiente que comprende un medio de indicador (por ejemplo, una proteína de unión a biotina, tal como avidina o estreptavidina) unido a la molécula indicadora (por ejemplo, un marcador enzimático o fluorescente).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Precipitación inmunitaria de parvovirus H-1

Carril 1: parvovirus H-1 inmunoprecipitado con anticuerpo monoclonal BL-H1; carril 2: control negativo que significa parvovirus H1 sin anticuerpo monoclonal BL-H1, de modo que no hay inmunoprecipitación; carril 3: positivo control: sólo parvovirus H-1 en gel de SDS e inmunotransferencia de tipo Western sin procedimiento de inmunoprecipitación; carril 4: marcador proteico; PBS: solución salina tamponada con fosfato; AcM BL-H1; aVP: anticuerpo policlonal que reconoce proteínas virales de parvovirus H-1 desnaturalizadas.

Figura 2: Inmunotransferencia puntual de tipo Western

Se genera una inmunotransferencia puntual de tipo Western con parvovirus H-1 nativo y desnaturalizado. BL-H1: anticuerpo monoclonal contra parvovirus H-1; aVP: anticuerpo policlonal que reconoce proteínas virales desnaturalizadas (con dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida y ditiotreitolo); nativo: parvovirus H-1 no tratado; control negativo: sin parvovirus H-1.

Figura 3: Distribución de H-1 wt y detección con anticuerpo monoclonal BL-H1

Con el fin de determinar si el anticuerpo monoclonal BL-H1 reacciona con cápsidas, proteínas de la cápsida mono/oligoméricas o proteínas de la cápsida desnaturalizadas, se prepara un extracto celular a partir de células 293T HEK, 24 h tras la transfección con pUC 19 Δ HindIII; se fracciona el extracto celular sobre un gradiente de sacarosa lineal. BL-H1: anticuerpo monoclonal contra parvovirus H-1; aVP: anticuerpo policlonal que reconoce proteínas virales de parvovirus H-1 desnaturalizadas; el plásmido pUC19 Δ HindIII contiene el genoma de parvovirus H-1 completo; Vg: partículas que contienen genoma viral analizadas mediante PCR en tiempo real; UI: unidades de infección; HA: hemaglutinación de parvovirus H-1 lleno o vacío.

Figura 4: Prueba de inmunofluorescencia de AcM BL-H1 (estabilidad de la actividad de BL-H1 7 y 21 días tras la purificación)

Tras su purificación, se almacena el anticuerpo BL-H1 a temperatura ambiente, 4°C y -20°C, respectivamente. Se

somete a prueba la actividad 21 días después mediante IF (inmunofluorescencia) en células NB-324K infectadas. El control positivo es un anticuerpo policlonal C8B10. El análisis se realiza mediante un microscopio Axioskop 2 plus y una cámara AxioCamMRc (aumentos: 40x).

5 Figura 5: Neutralización de células NB-324 K infectadas con parvovirus H-1

Se muestra la neutralización de parvovirus H-1 con el ensayo de MTT medido a 550 nm (abs 550 nm) con MOI de 1 con cualquiera de parvovirus H-1 de tipo natural y recombinante. Se sometieron a prueba concentraciones de B1-H1 de desde 0 ng hasta 5000 ng, correspondientes a de 3E5 a 3E7 parvovirus H-1/μg de BL-H1.

10

Figura 6: Neutralización de PV H-1 wt con AcM BL-H1

Se muestra la neutralización de parvovirus H-1 mediante ensayo de placas en células NB-324K con MOI de 1 y 10. Se neutralizaron parvovirus H-1 o bien 3E4 o bien 1E5 con 1 μg de BL-H1. CN = control negativo; CP = control positivo.

15

Figura 7: H-1 rec. EGFP (proteína fluorescente verde)

Se infectan células NB-324K con parvovirus H-1 recombinante que contiene proteína fluorescente verde (GFP) con MOI de 1 y 10 y se neutralizan con una concentración de B1-H1 de desde 0 ng hasta 5000 ng. Se analiza GFP con 40x aumentos. No se observa efecto de inhibición de la infección con BL-H1 sobre células NB-324K mediante preincubación con B1-H1 durante la noche (o/n) y siguió la infección por parvovirus H-1.

20

Figura 8: Desarrollo de ELISA para la detección de PV H-1

25

Se miden cápsidas de parvovirus H-1 a 450 nm en un espectrofotómetro para evaluar la curva patrón. Se usan todavía ahora tres concentraciones diferentes (anticuerpo secundario 0,75 μg/ml; 0,5 μg/ml y 0,1 μg/ml).

30

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Métodos generales

35 (A) INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB/C CON PARVOVIRUS H-1

Se inmunizaron ratones según el siguiente programa:

40

(1) Una semana antes de la inyección

Tras la anestesia se tomaron 15 μl de sangre a través de punción retroorbital (control negativo).

(2) Inmunización

45

Anestesia: Inyección intraperitoneal [i.p.] de 100 μl de clorhidrato de xilacina al 0,20% (Rompun, Bayer) en PBS y 10 μg de clorhidrato de ketamina (Ketavalt, Parke-Davis) por cada 10 g de peso corporal en PBS.

(3) 1. Inyección de parvovirus H-1

50

100 μl virus en disolución de Visipaque-Ringer al 40%

(=7x10¹⁰ partículas que contienen genoma viral [Vg] = 1,2x10⁸ unidades formadoras de placas [UFP])

+ 50 μl de PBS

55

+ 150 μl de adyuvante incompleto.

Mezclar e inyectar por vía s.c. en 4 posiciones diferentes cada 60 μl.

60

(4) 2. Inyección de parvovirus H-1, 1 mes tras la primera inyección

Procedimiento como 1. inyección.

(5) 3. Inyección de parvovirus H-1, 2 meses tras la primera inyección

65

Refuerzo: 1 semana antes de extraer el bazo

100 µl de virus (7×10^{10} Vg = $1,2 \times 10^8$ UFP)

5 +200 µl de PBS por vía i.p.

(B) GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS

Se generaron hibridomas según el siguiente programa:

10

MEDIOS:

Medio de trabajo: RPMI 1640 (n.º de Gibco R8758)

15

Medio de hibridomas: 500 ml de RPMI 1640 (n.º de Gibco R8758)

+ 5 ml de L-glutamina 200 mM (Gibco)

20

+5 ml de pen./estrep. (penicilina 10000 U/ml; estreptomicina 10 mg/ml (Gibco)

+10 ml de Hepes 1 M, pH 7,2 (Sigma)

+50 ml de FCS (fusión sometida a prueba, 30 min. de inactivación con calor a 56°C)

25

Medio de selección: medio de hibridoma + 10 ml de concentrado de HAT 50x (Gibco)

BM Condi-Med (para la selección) 10%

REACTIVO DE FUSIÓN:

30

PEG 1500 (n.º de Roche: 783641)

CÉLULAS:

35

Ag8/X63 (células tumorales de células B)

Se descongelan las células al menos una semana antes de la fusión, se cultivan en medio de hibridomas y se dividen 1 día antes de la fusión. Las células deben estar en la fase de proliferación.

40

FUSIÓN:

Preparación: 1-2 días antes de la fusión

1 día antes de la fusión: dividir células Ag8 (total 18; deben estar en fase de proliferación).

45

Día de la fusión:

Calentar todos los medios y disolver hasta 37°C.

50

Preparación de las células Ag8:

Reunir las células Ag8, centrifugar 7 min. a 264 x g, ponerlas en 30-40 ml de medio de trabajo y contar las células ($\sim 1-2 \times 10^8$ células).

55

Preparación del bazo:

Tras la anestesia sacrificar el ratón, ponerlo en etanol al 70% para desinfectarlo y sujetar el ratón a una base estéril, extraer el bazo con pinzas y tijeras estériles y ponerlo en medio de trabajo en una placa, puncionar el corazón para obtener sangre y recogerla en un tubo de 1,5 ml. Tener cuidado con los ganglios linfáticos.

60

Células del bazo:

Cortar el bazo varias veces con las tijeras, descomponer el bazo con el portaobjetos estéril (triturar), tomar la bolsa del bazo y enjuagarla con medio de trabajo, desechar la bolsa del bazo, homogeneizar las células del bazo con una pipeta Pasteur, recoger la suspensión celular en un tubo de 50 ml, dejar que el tejido de la bolsa se sedimente y tomar el sobrenadante en un nuevo tubo de 50 ml, centrifugar las células, 264 x g, 7 min., lavar las células una vez

65

ES 2 438 774 T3

con medio de trabajo, centrifugar las células, 264 x g, 7 min., tomar el sedimento en 2-5 ml de medio de trabajo y contar las células (deben ser de 5×10^7 hasta 3×10^8 células).

Fusión de las células del bazo con células Ag8:

- 5 Mezclar células del bazo: Ag8 = 3:1 en un tubo de 50 ml, centrifugar las células mezcladas, 264 x g, 7 min., cada sedimento celular no debe tener más de 1×10^8 células totales, desechar el sobrenadante, romper el sedimento golpeando suavemente el fondo del tubo, añadir 1 ml de PEG 1500 al sedimento usando una pipeta de 1 ml a lo largo de un periodo de 1 min. de agitación continua. Continuar agitando durante 2 min. adicionales, añadir cuidadosamente 10 ml de medio de selección a lo largo de un periodo de 3 min. mediante agitación continua. Añadir 10 ml adicionales de medio de selección, centrifugar las células mezcladas 120 x g, 7 min., desechar el sobrenadante, romper el sedimento golpeando suavemente el fondo del tubo, lavar de nuevo (añadir 10 ml adicionales de medio de selección, centrifugar las células mezcladas, 120 x g, 7 min., romper el sedimento golpeando suavemente el fondo del tubo), preparar una placa de 96 pocillos con 100 μ l de medio de selección (cada pocillo 2×10^5 células/pocillo (= 2×10^8 /ml, 2×10^7 /10 ml).

Control de Ag8: sembrar 1×10^4 células/pocillo en medio de selección (alrededor de 24 pocillos, no más).

Sangre:

- 20 Tras 30 min. (hemaglutinación), centrifugar (5000xg, 10 min.), tomar el suero en un tubo nuevo (control positivo).

Observación:

- 25 Tras 2-7 días: controlar las células Ag8 en medio de selección HAT (deben estar muertas).
Tras 1 semana: alimentar las células fusionadas, tomar 100 μ l por pocillo, desechar, alimentar 100 μ l de medio de selección HAT nuevo.
- 30 Tras 2 semanas: Debe iniciarse el examen (medio con BM CondiMed 10%), inmunofluorescencia, inmunotransferencia puntual de tipo Western.

Selección:

- 35 Deben seleccionarse pocillos examinados como positivos.
1. selección: Deben sembrarse en placa pocillos POS: cada placa de 96 pocillos 5 células/pocillo, 1 célula/pocillo;
 2. selección: Deben sembrarse en placa pocillos POS: cada placa de 96 pocillos 5 células/pocillo, 1 célula/pocillo;
 3. selección: Deben sembrarse en placa pocillos POS: cada placa de 96 pocillos 5 células/pocillo, 1 célula/pocillo.

(C) PRODUCCIÓN DE ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA MATERIAL DE LA CÁPSIDA DE H-1 WT:

- 45 Frasco T de Greiner Bio-one con filtro estéril, 75 cm² o 150 cm²; medio RPMI con FCS al 10%, L-glutamina al 1% (2,5 mM), P/S al 1%, HEPES 20 mM; células de hibridoma BL-H1; pipetas (5, 10, 20 ml); tubos (15, 50 ml); botella de 1 l; baño de agua; y centrifuga.

Información:

- 50 Tiempo de generación de BL-H1: ~ 27 h;
células en suspensión;
- 55 intercambio de medio: medio de centrifuga con células: 300 x g; 10 min.;
- recogida de B1-H1: centrifugación: 5000 x g; 5 min.;
- el crecimiento celular de BL-H1 es mejor con una concentración de glucosa superior;
- 60 RPMI contiene glucosa 2 g/l, un aumento de 3 ó 4 g/l podría ser una mejora de la producción de anticuerpos; son posibles densidades celulares de hasta 2×10^6 células/ml.

Producción:

- 65 Frasco de 75 cm² con 10 ml, en frasco de 150 cm² con suspensión celular de 20 ml; cultivo de células BL-H1 en

medio RPMI. Densidad celular al comienzo: 2×10^5 células/ml es ideal; también es posible 1×10^5 células/ml, pero el crecimiento celular es más lento al comienzo; también es posible 3×10^5 células/ml, pero entonces las células tienen que dividirse tras 2 d o 3 d, de lo contrario disminuye la vitalidad;

5 dividir las células tras 3 d (opcional 4 d);

un 15-20% de medio condicionado con medio nuevo aumenta la viabilidad celular tras el intercambio de medio.

10 (D) PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL BL-H1 CON CROMATOLOGRAFÍA DE AFINIDAD

10 Material:

15 Aparato ÄKTA Prime, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg; etanol al 70% (en H₂O); etanol al 20% (en H₂O); tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0 (tampón de equilibrado = tampón A); Tris-HCl 1 M, pH 9,0 (tampón de neutralización); tubos de 50 ml; tubos de fondo redondo de poliestireno; ácido cítrico 0,1 M, pH 4,0 (tampón de elución = tampón B); columna HiTrap de proteína A HP de 5 ml.

20 Todos los tampones deben filtrarse con filtros de tipo botella y deben desgasificarse con ultrasonidos durante 10 min. a temperatura ambiente con un 100% (480 W).

20 Procedimiento:

25 Uso del sistema Äkta prime: Enjuagar el sistema con etanol al 20% en primer lugar. Poner el tubo A y el tubo B en etanol al 20% y pulsar "método almacenado de ejecución" y elegir el programa 1. Después de eso, poner los tubos con H₂O y elegir de nuevo el programa 1. Llenar ahora cada tubo con tampón de equilibrado y conectar todos los tubos. Se almacena la columna en etanol al 20% y debe enjuagarse directamente con tampón de equilibrado. El límite de presión es de 0,3 MPa. La velocidad de flujo con un 100% de tampón A (= 0% de tampón B) para la columna de proteína A es de 5 ml/min. *Proteína G alternativa: 1 ml/min. (independiente de la cantidad de columnas en serie).*

30 La cromatografía debe ejecutarse en el menú principal a través de "ejecución manual". Para el enjuague y la carga, se usan las siguientes condiciones:

35 Fijar la base del método (ml)

Fijar la concentración, % de B (0%)

Fijar el gradiente (apagado)

40 Fijar la velocidad de flujo (A: 1 ml/min., B: 5 ml/min.)

Fijar la base de fracción (ml)

Fijar el tamaño de fracción (0)

45 Fijar el límite de presión (0,3 MPa)

Fijar la posición de la válvula de tampón (pos. 1)

50 Fijar la posición de la válvula de inyección (carga)

Iniciar la ejecución

55 La cromatografía debe ejecutarse dentro del menú principal a través de "ejecución manual". La columna debe enjuagarse con tampón para que el nivel inicial de UV sea permanente. Antes de la carga de la columna, poner en la ejecución manual "auto cero", esto reinicia el nivel inicial de UV a cero. Cargar el "medio de anticuerpo" a través del tubo A. Por tanto, poner el tubo A en "medio de anticuerpo", mantener pulsado "romper", de lo contrario entran burbujas de aire en el sistema. Después de eso, pulsar "continuar". Al final pulsar "romper" y volver al tubo A, pulsar continuar para el lavado. Lavar hasta que el nivel inicial de UV sea casi cero. La fracción no retenida durante la carga y el lavado deben recogerse en una botella extra (en el caso de que la columna esté sobrecargada: esto podría observarse a través de un aumento adicional de la señal de UV. De este modo, la fracción no retenida podría usarse por segunda vez.

60 Volver al 100% de tampón B, todos los otros parámetros son todavía los mismos.

65 Fijar la base del método (ml)

Fijar la concentración, % de B (100%)

Fijar el gradiente (apagado)

5 Fijar la velocidad de flujo (A: 1 ml/min., B: 5 ml/min.)

Fijar la base de fracción (ml)

10 Fijar el tamaño de fracción (0)

Fijar el límite de presión (0,3 MPa)

Fijar la posición de la válvula de tampón (pos. 1)

15 Fijar la posición de la válvula de inyección (carga)

Iniciar la ejecución

20 Tan pronto como el tampón B alcanza la columna, el anticuerpo comienza a eluir. La señal UV aumenta fuertemente. Pueden recogerse las fracciones a través del tubo del colector de fracciones. Se recomienda recoger al menos dos fracciones, debido a las diferentes concentraciones de anticuerpo.

25 Debido a que las fracciones se recogen manualmente, puede fijarse en la ejecución manual "fijar marca de acontecimiento" para observar el comienzo y el final. Las fracciones eluidas deben llevarse directamente a pH 1 con tampón de neutralización. La primera fracción podría contener todavía un poco de tampón A, por tanto no es fácil saber de antemano el volumen de tampón de neutralización. Debe comprobarse con papel de pH muy rápido para evitar la inestabilidad. Valor recomendado para el 100% de tampón B:

Cromatografía	Elución de fracciones [ml]	Tampón de neutralización [ml]
Proteína G	0,8	-0,025
Proteína A	2	~0,25

30 Después de que el pico esté en el nivel inicial, cambiar a tampón A:

Fijar la base del método (ml)

35 Fijar la concentración, % de B (0%)

Fijar el gradiente (apagado)

Fijar la velocidad de flujo (A: 1 ml/min., B: 5 ml/min.)

40 Fijar la base de fracción (ml)

Fijar el tamaño de fracción (0)

45 Fijar el límite de presión (0,3 MPa)

Fijar la posición de la válvula de tampón (pos. 1)

Fijar la posición de la válvula de inyección (carga)

50 Iniciar la ejecución

El almacenamiento de la columna y el sistema debe ser en etanol al 20%. Enjuagar el sistema completo [véase el protocolo P-19-2 A].

55 (E) ELISA DE CÁPSIDA DE H1

Material:

60 • Placa flexible, 96 pocillos, fondo de U sin tapa, BD Falcon; tapa para microplacas, Greiner BioOne; caseína de leche bovina, Sigma; PBS + Tween al 0,05%; PBS (en H₂O); para el recubrimiento: fracción de BL-H1 E1, IgG_{2A} BL-

ES 2 438 774 T3

H1 2 mg/ml (10 mg/ml de proteína total, IgG2A+proteína foránea) en tampón glicina 0,1 M neutralizado con Tris-HCl, almacenado a 4°C; para la detección: BL-H1-HRP en tampón fosfato de sodio, aprox. 1 mg/ml, congelado a -20°C, 10 µl por tubo; patrón: HV Pool green 1- 2/1- 3/3- 3/4- 2/4- 3/5- 2/6- 2/7- 2 1, 5x10¹¹ V0/ml, 7,5x10¹¹ cápsidas/ml en Visipaque al 40%, almacenado a 4°C; control positivo: P#30/07β, 9, 1x10¹¹ Vg/ml en Visipaque al 40% (~1x10¹³ cápsidas/ml estimado), almacenado a 4°C; cubierta adhesiva óptica (Fa. Applied Biosystems); TMB, super slow, sistema de sustrato líquido para ELISA, Sigma, almacenado a 4°C; disolución de parada: H₂SO₄ 1 N, almacenado a temperatura ambiente; fotómetro de placas de microtitulación Multiskan EX, Thermo Scientific.

Tampones:

Tampón de lavado: Añadir Tween al 0,05% a PBS (véase la disolución madre para la inmunotransferencia (puntual) de tipo Western).

Disolución de recubrimiento: Prepararla directamente antes de su uso. Diluir E1 hasta 2,5 µg/ml en PBS (en H₂O), quiere decir 1:800. Para una placa 10 ml de dilución.

Tampón de bloqueo (BB): Caseína 2 mg/ml en PBS + Tween al 0,05%. Prepararlo siempre nuevo. Calentar 400 ml de PBS + Tween al 0,05% hasta ~50°C (durante 40-50 s en microondas), verterlo en un vaso de precipitados y añadir la cantidad necesaria de caseína. Agitar con calentamiento durante 30 min., alrededor de 50°C hasta 1 h hasta que todo se disuelva. Enfriar hasta 37°C en un baño de agua para su uso. 100 ml son suficientes para una placa.

Detección: Prepararlo directamente antes de su uso. Diluir BL-H1-HRP (2.Ac) hasta 0,1 µg/ml en tampón de bloqueo, quiere decir 1:10.000. Para una placa 10 ml de dilución.

Patrón: Diluir HV pool green hasta un patrón entre 2,5x10⁹ y 3,91x10⁷ cápsidas/pocillo. Para dos filas de patrón: Preparar 600 µl de un patrón de 2,50x10⁹ (doble) cápsidas/pocillo a partir de la patrón madre mediante una dilución 1:30 (2,5x10¹⁰ cápsidas/ml) en tampón de bloqueo. Añadir 300 µl de tampón de bloqueo a 6 tubos de 1,5 ml y etiquetarlos como 1,25E+09, 6,25E+08, 3,13E+08, 1,56E+08, 7,81E+07, 3,91E+07 cápsidas/pocillo. Realizar diluciones en serie añadiendo 300 µl de cada patrón al siguiente tubo y agitar con vórtex entre cada transferencia. PBS sirve como blanco (también puede usarse tampón de bloqueo).

Control positivo: Diluir 1:700 en BB, proporciona alrededor de 4,2x10⁹ cápsidas/pocillo resp. 2,9x10¹² cápsidas/pocillo en el original. Procesar al menos 4 pocillos con control por placa. Como control negativo para P#30/07β diluir Visipaque al 40% 1:700 en BB.

Realización:

d 0

Por la tarde: Recubrir la placa flexible durante la noche a 4°C con 100 µl/pocillo de disolución de recubrimiento. Cerrar la placa con la tapa para microplacas. Realizar esto cuidadosamente para no salpicar el líquido de los pocillos contra la tapa.

d 1

Alternativamente, la placa puede recubrirse por la mañana con incubación durante 2 h a TA.

1. Preparar tampón de bloqueo tal como se describió anteriormente. Eliminar la disolución de recubrimiento de la placa invirtiendo y secando sobre papel absorbente para eliminar cualquier disolución de recubrimiento residual. Añadir 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo, cerrar la placa con la tapa e incubar a 37°C durante 1 h.

2. Durante el bloqueo de la tapa, preparar el patrón y el control positivo tal como se describió anteriormente. Para las diluciones de la muestra estimar las cápsidas/ml por medio del título de Vg/ml. Realizar varias diluciones alrededor del valor estimado para cubrir un intervalo más amplio. Preparar el control negativo con tampón de la matriz de muestra (prestar atención a la dilución de la muestra).

3. Aspirar los pocillos y lavar 2 veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado. Tras el último lavado, invertir la placa y secar sobre una toallita de papel absorbente para eliminar cualquier tampón residual.

4. A partir de aquí todas las etapas con la placa bajo una cabina estéril. Añadir 100 µl de patrón, control positivo, control negativo resp. o muestra a cada pocillo. Cerrar la placa con la tapa. Incubar a 37°C durante 1 h.

5. Eliminar el control positivo, el control negativo resp. o la muestra con una pipeta, cambiando las puntas para muestras diferentes. Lavar 3 veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado. Tras el último lavado, secar la superficie

de la placa con una toallita de papel. Recoger el desecho en un vaso de precipitados.

6. Añadir 100 µl/pocillo de BL-H1-HRP diluido a cada pocillo. Cerrar la placa con la tapa e incubar a 37°C durante 1 h.

7. Eliminar el anticuerpo de detección con una pipeta de 12 canales. Lavar 4 veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado. Tras el último lavado, secar la superficie de la placa con una toallita de papel. Intentar eliminar tanto líquido como sea posible. Recoger el desecho en un vaso de precipitados (puede usarse una pipeta de 12 canales) bajo una cabina estéril.

8. Todavía bajo una cabina estéril: Añadir 100 µl/pocillo de disolución de TMB a cada pocillo e incubar durante alrededor de 15 min. a TA en la oscuridad. Comprobar tras alrededor de 10 min. si la intensidad de reacción es buena.

9. Parar la reacción añadiendo 100 µl/pocillo de disolución de parada a cada pocillo. Sellar la placa con cubierta adhesiva óptica.

10. Leer la absorbancia a 450 nm en el plazo de 30 min. de la parada de la reacción. Usar un fotómetro de placas de microtitulación Multiskan EX. Para una corrección opcional de los resultados, leer la placa adicionalmente a 550 nm y 595 nm.

Consejo adicional:

El bloqueo no debe realizarse a lo largo de un periodo de tiempo más largo que durante la noche. Una incubación más larga conduce a la formación de agregados, etc. Todas las diluciones de virus y anticuerpo deben prepararse directamente antes de su uso. Los pocillos deben enjuagarse cuidadosamente para evitar pérdida de anticuerpo unido. Además, es importante añadir TMB en etapas de tiempo iguales a cada fila. Deben usarse las mismas etapas de tiempo para la parada de la reacción, para minimizar la variación entre dos filas. Cuando se elimina el líquido restante con una pipeta, tocar el fondo del pocillo sólo ligeramente y no raspar, para evitar la pérdida de reactivos unidos. La incubación de la placa a 37°C puede provocar efectos de borde porque el poliestireno es un conductor del calor débil. Por tanto, es importante mantener el tampón de bloqueo durante la realización del ensayo a 37°C. Esto minimizará los efectos de borde a un nivel inferior. El anticuerpo secundario marcado no debe congelarse de nuevo tras su uso. Esto conduciría a una intensidad inferior de la señal. El tampón de bloqueo que contiene la caseína puede almacenarse al menos durante 4 semanas congelado a -20°C. El procedimiento de dilución debe realizarse cuidadosamente, ya que los errores aquí conducen a resultados incorrectos. No deben realizarse tantas diluciones una después de otra y deben realizarse muy exactas.

Ejemplo 2

40 Caracterización del anticuerpo monoclonal BL-H1 contra la cápsida de H-1

Para evaluar la capacidad del anticuerpo BL-H1 para inmunoprecipitar parvovirus H-1, se incubaron juntos anticuerpo y parvovirus durante la noche a 37°C. Se precipitaron complejos inmunitarios mediante proteína A-Sepharose y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo contra proteínas virales desnaturalizadas. Esto muestra que el anticuerpo BL-H1 reconoce la cápsida de parvovirus H-1 ensamblada [figura 1].

Para caracterizar esta identificación, se transfirió parvovirus H-1 o bien nativo o bien desnaturalizado a una membrana de nitrocelulosa [figura 2]. El anticuerpo BL-H1 reconoce sólo partículas nativas mientras que el anticuerpo policlonal reconoce cápsidas desnaturalizadas.

Con el fin de determinar si el anticuerpo BL-H1 reacciona con cápsidas o también con proteínas virales nativas, se prepararon extractos de células 293T transfectadas con plásmidos de expresión de proteínas de la cápsida y se fraccionaron en un gradiente de sacarosa lineal [figura 3]. BL-H1 muestra un pico entre las fracciones 8-18 correspondientes a partículas de parvovirus H-1 llenas y vacías. Las cápsidas llenas o vacías se demuestran por medio de hemaglutinación [fracciones 8-17]. Se determinan cápsidas llenas por medio de partículas que contienen genoma viral [fracciones 10-17] y partículas activas por medio de unidades de infección [fracciones 12-18]. En contraposición, se detectaron proteínas virales no ensambladas en las fracciones 3-14 con un anticuerpo contra proteínas virales. Finalmente, no hay reactividad de BLH1 con proteínas de la cápsida no desnaturalizadas así como desnaturalizadas. BL-H1 reconoce específicamente epítopos conformacionales presentes en cápsidas de parvovirus H-1 ensambladas. Conjuntamente, esto muestra que BL-H1 reconoce epítopos estructurales presentados sólo por partículas ensambladas.

La figura 4 muestra la detección de la producción de H-1 en células NB-324K infectadas con BL-H1 mediante inmunofluorescencia. El anticuerpo BL-H1 es estable al menos durante 3 semanas almacenado a temperatura ambiente, 4°C y -20°C.

En las figuras 5, 6 y 7, se demuestra la capacidad neutralización por BL-H1 del parvovirus H-1.

5 Se realizó un ensayo de MTT para hallar la razón correcta entre parvovirus H-1 y anticuerpo BL-H1. 1 µg de BL-H1 es eficaz para neutralizar hasta 1E5 parvovirus H-1 [figura 5].

10 Pudo lograrse un 95% de neutralización con 1 µg de BL-H1 por 1E5 parvovirus H-1 determinada mediante ensayo de placas [figura 6]. También se muestra esta capacidad de neutralización con parvovirus H-1 recombinante que expresa proteína fluorescente verde [figura 7 panel superior]. Para mostrar que el propio BL-H1 no actúa indirectamente interaccionando con receptores celulares, se preincubaron células NB-324K con anticuerpo BL-H1 durante la noche y después de eso se infectaron con parvovirus H-1 [figura 7 panel inferior].

Ejemplo 3

15 ELISA de cápsida de H-1

20 Se ha evaluado la cuantificación de parvovirus H-1 usando BL-H1 con ELISA. Los primeros resultados muestran una razón entre cápsidas y partículas que contienen genoma viral de aproximadamente 5 [figura 8, parte inferior]. Se usaron tres concentraciones de anticuerpo secundario (de 0,1 µg/ml a 0,75 µg/ml), sin mostrar diferencias significativas en la recuperación [figura 8, parte superior].

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a una cápsida de parvovirus H-1 llena o vacía, uniéndose dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo sólo a una cápsida de parvovirus H-1 nativa pero no a proteínas de la cápsida de parvovirus H-1 desnaturalizadas.
2. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo neutralizante.
- 10 3. Anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2, que es un anticuerpo monoclonal.
4. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 3, que se produce mediante la línea celular de hibridoma BL-H1 que se ha depositado en la DSMZ con el número ACC3030.
- 15 5. Anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, que se une al mismo epítipo que el anticuerpo según la reivindicación 4.
- 20 6. Anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, que compete por la unión a una cápsida de parvovirus H-1 llena o vacía con el anticuerpo según la reivindicación 4.
7. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que porta un marcador detectable.
- 25 8. Línea celular que produce un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Línea celular según la reivindicación 8, que es la línea celular de hibridoma BL-H1 que se depositó en la DSMZ con el número ACC3030.
- 30 10. Ácido nucleico, que codifica para un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
- 35 11. Composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. Uso de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el diagnóstico *in vitro* de una infección por parvovirus.
- 40 13. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 14. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, para su uso en un método para el tratamiento de una infección por parvovirus H-1 o una enfermedad provocada por dicha infección.
- 50 15. Uso de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección por parvovirus H-1 o una enfermedad provocada por dicha infección.
16. Kit útil para el diagnóstico o la terapia de una infección por parvovirus H-1 o una enfermedad provocada por dicha infección que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.
17. Kit según la reivindicación 16, que comprende además al menos un tampón.

Figura 1

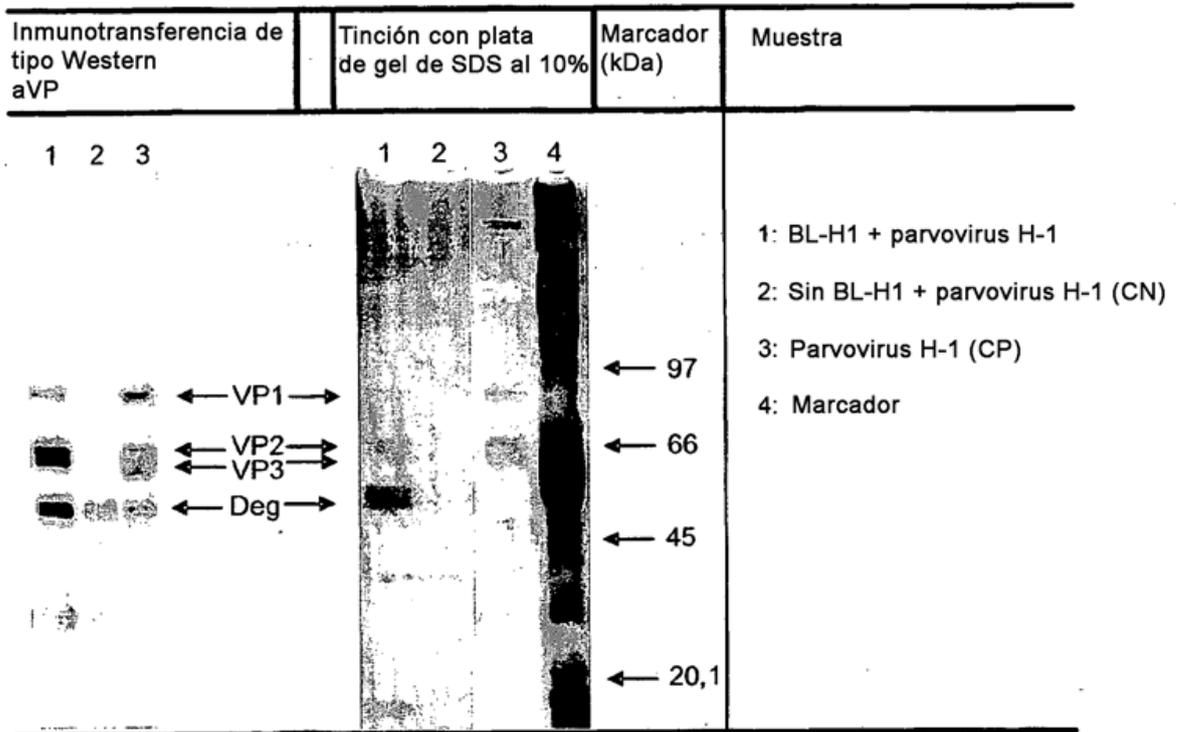


Figura 2

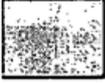
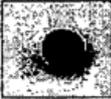
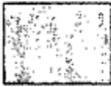
	Cápsidas		Control negativo
	Desnaturalizadas	Nativas	
BL-H1			
α VP			

Figura 3

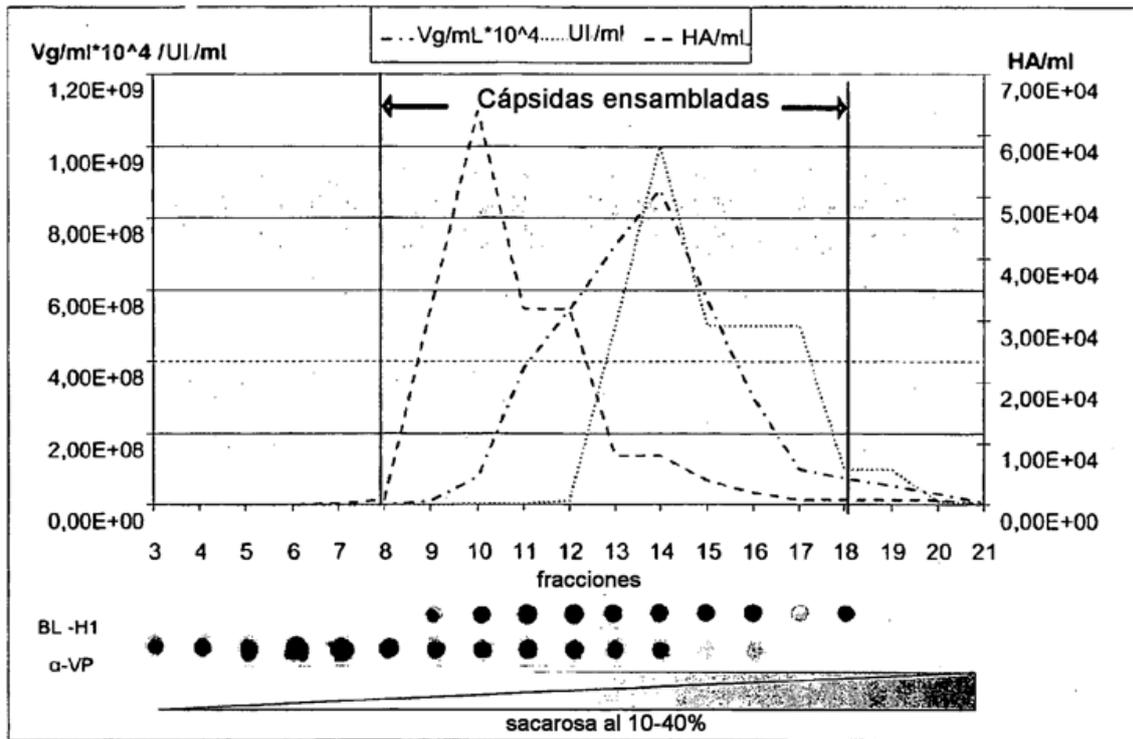


Figura 4

Estabilidad:

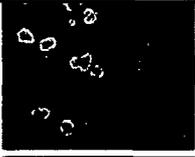
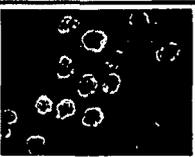
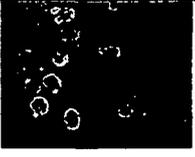
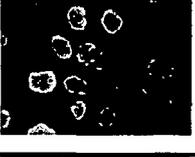
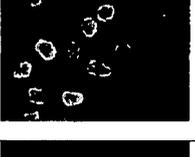
Almacenamiento	7d		21d	
	MFP 488	DAPI	MFP 488	DAPI
TA				
4°C				
-20°C				
Positivo				
Negativo				

Figura 5

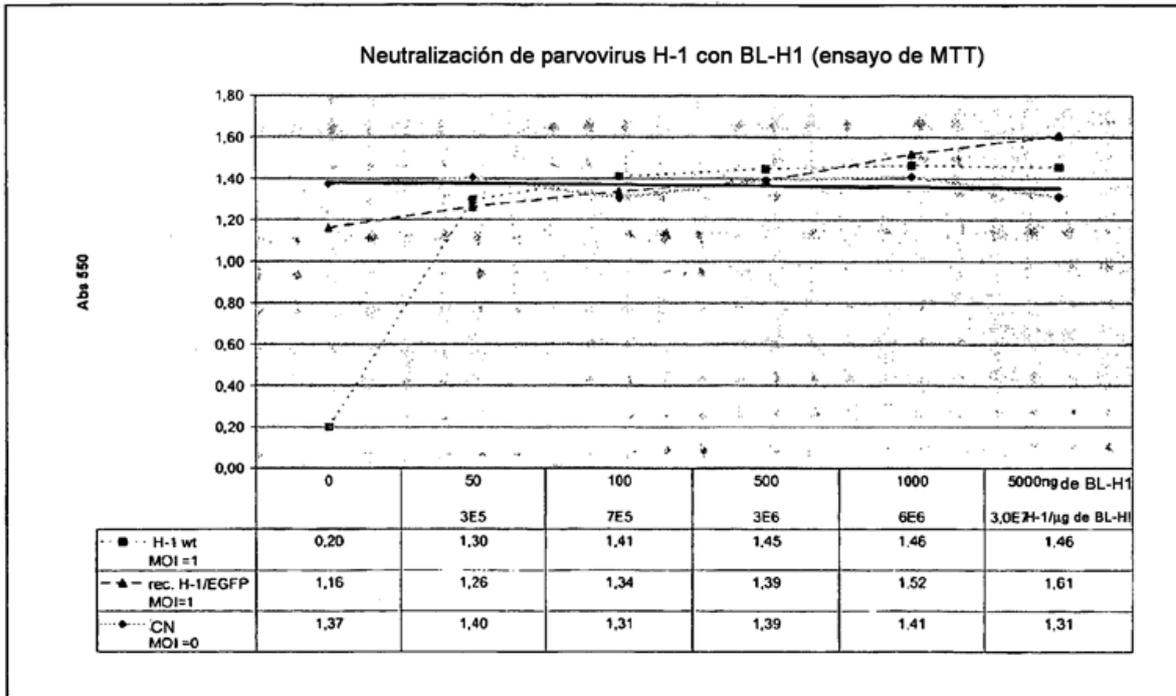


Figura 6

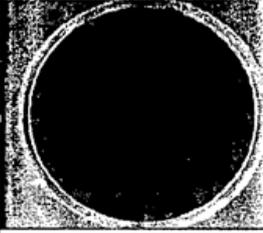
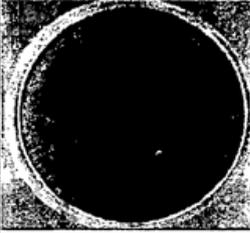
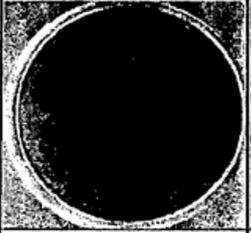
	Sin Ac BL-H1	Incubación de virus con α BL-H1 durante 1 h	
		1E4 H1-PV/ μ g de BL-H1	1E5 H1-PV/ μ g de BL-H1
MOI 1E-4			
MOI 1E-5			
	100% de infección	7,3% de infección 92,7% de neutralización	4,5% de infección 95,4% de neutralización

Figura 7

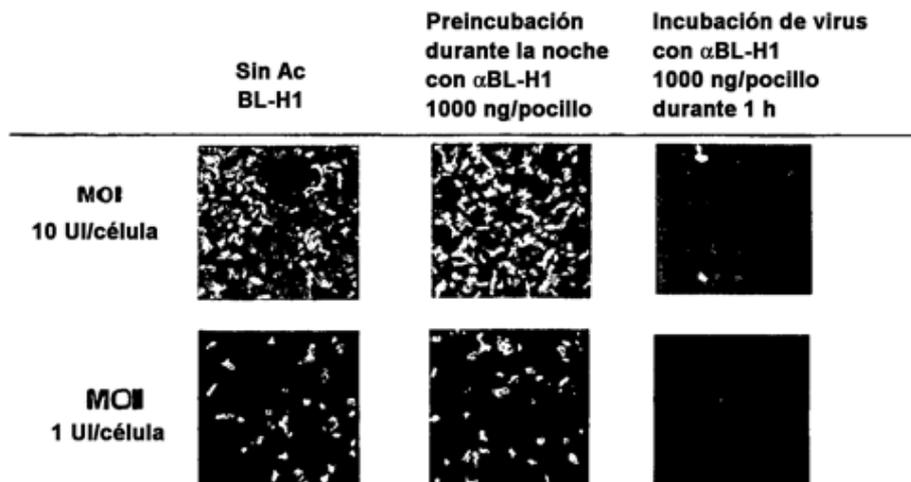
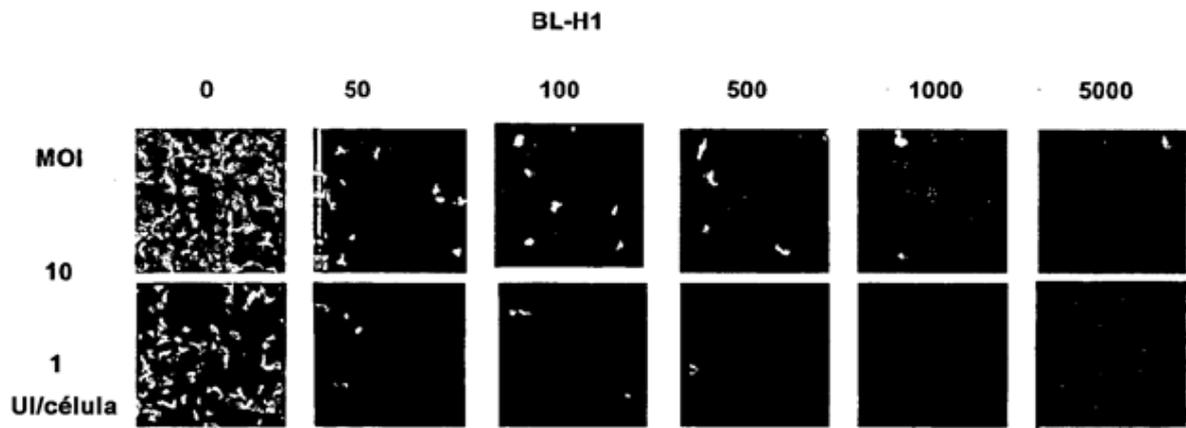
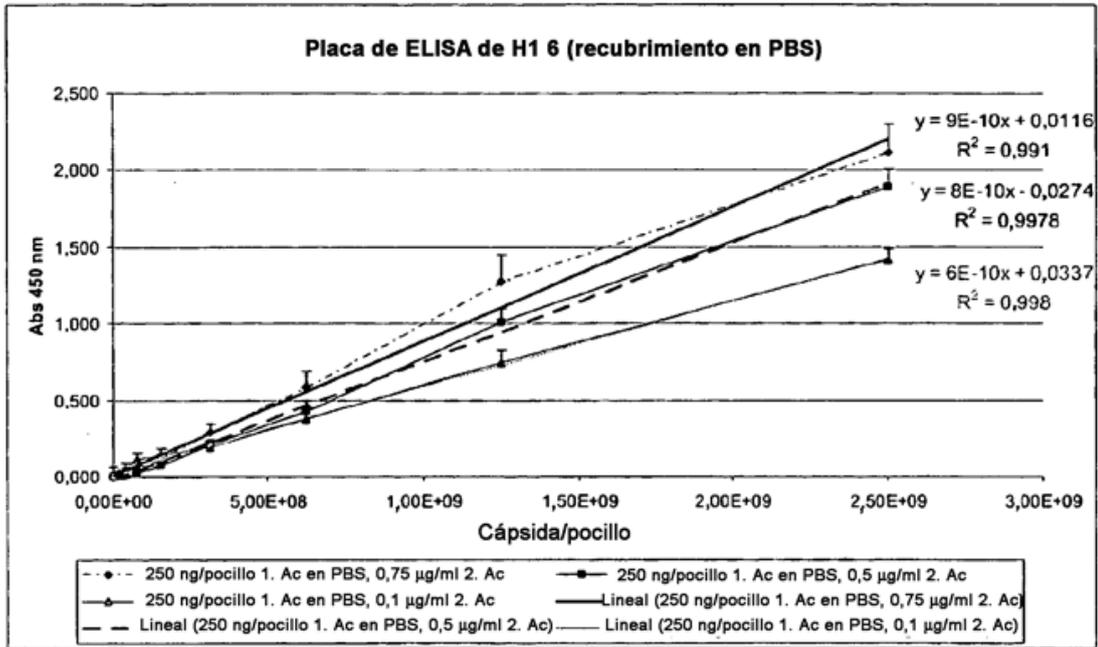


Figura 8



	Fórmula	2. Concentración de Ac	Cápsida/ml	Vg/ml	Razón Cápsida/Vg
P#30/07B	$y=9E-10x+ 0,0116$	0,75µg/ml	2,79E+12	9,10E+11	3,1
	$y=8E-10x+ 0,0274$	0,5µg/ml	3,19E+12	9,10E+11	3,5
	$Y=6E-10x+ 0,0337$	0,1µg/ml	2,46E+12	9,10E+11	2,7
P#69/08B	$y=9E-10x+ 0,0116$	0,1µg/ml	9,50E+12	1,90E+12	5,0
P#68/08B	$y=9E-10x+ 0,0116$	0,1µg/ml	6,89E+09	9,70E+08	7,1