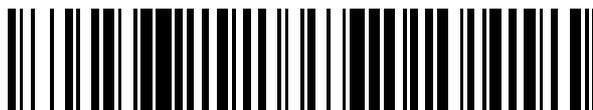


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 369**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/42** (2006.01)  
**C07K 14/16** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C07K 16/10** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**C12N 9/00** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2002 E 10183175 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2295082**

54 Título: **Método para la producción de anticuerpos catalíticos (variantes), antígenos para inmunización y secuencia de nucleótidos**

30 Prioridad:

**24.04.2001 RU 2001110759**

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

**28.01.2014**

73 Titular/es:

**LIFEBIO LABORATORIES LLC (100.0%)  
341 Raven Circle, Kent County  
Wyoming, DE 19934, US**

72 Inventor/es:

**GABIBOV, ALEXANDR;  
KOLESNIKOV, ALEXANDR;  
PONOMARENKO, NATALYA;  
ALEXANDROVA, ELENA;  
VOROBIEV, IVAN y  
DEMIN, ALEXANDR**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 440 369 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Método para la producción de anticuerpos catalíticos (variantes), antígenos para inmunización y secuencia de nucleótidos.

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con biotecnología, inmunología, ingeniería genética, las industrias microbiológicas y medicinales y comprende un enfoque combinado para la fabricación y la expresión de anticuerpos catalíticamente activos que son terapéuticos potenciales destinados a destruir antígenos de proteína, en particular, la gp120, que es la principal proteína de superficie del virus de inmunodeficiencia humana.

Estado de la técnica

10 Se sabe que se pueden diseñar anticuerpos catalíticos dirigidos a las sustancias fisiológicamente activas y a objetos naturales útiles en biomedicina como representaciones específicas de los estados de transición de conversiones químicas modeladas. La patente de los Estados Unidos No. 5.948.658 da a conocer un anticuerpo diseñado por el enfoque anterior y capaz de escindir específicamente al narcótico cocaína. A pesar de una tecnología altamente desarrollada para la producción de anticuerpos monoclonales, este enfoque no puede ser efectivo en el caso de  
 15 biopolímeros, proteínas y péptidos de elevado peso molecular debido a que es difícil modelar los correspondientes estados de transición de la reacción.

La producción de anticuerpos catalíticos activos directamente contra la gp120 se da a conocer en el documento WO 9703696; sin embargo, de acuerdo con el documento WO 9703696, se obtiene el anticuerpo a partir del suero del paciente, lo que impide el desarrollo de una tecnología médica unificada para la producción de un medicamento.

20 Resumen de la invención

La proteína de fusión de la invención tiene la siguiente estructura:

```

MATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTD 50
PNPQEVVLSCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFNGT 100
GPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGLSLAEDEVVIRSVNFTDNAKTIIV 150
QLNTSVEINCTHCNISRAKWNNTLQKQIASKLREQFGNNKTIIFKQSSGGD 200
PEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTEGSDTITLPC 250
RIKQIINMWQKVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLLTRDGGNSNNESEIF 300
RPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTKAK 334
    
```

25 El objetivo de la presente invención es desarrollar un método para producir anticuerpos catalíticos contra proteínas y péptidos, en particular la gp120, con el uso de animales con patologías autoinmunes espontáneas e inducibles, donde dicho método hará posible el diseño de una "vacuna catalítica" que, después de ser inyectada a un paciente, es capaz no sólo de enlazarse con el antígeno, sino también de destruirlo inhibiendo así el desarrollo de la enfermedad.

30 Se proporciona un método para la producción de anticuerpos catalíticos con el uso de animales con patologías autoinmunes espontáneas e inducidas. Se utilizan ratones como los animales con patologías autoinmunes espontáneas e inducidas. Los ratones usados pertenecen a cepas para las que la inmunización con proteína básica de mielina o su fragmento puede inducir el desarrollo de encefalomiелitis autoinmune experimental. A los animales se les administra una proteína de fusión que consta de la proteína básica de mielina o de sus fragmentos y un sustrato potencial de anticuerpo catalítico o un fragmento del sustrato potencial. El sustrato potencial es la gp120 (glicoproteína de superficie del VIH-1) o sus fragmentos.

35 Se proporciona una proteína de fusión que tiene la siguiente estructura:

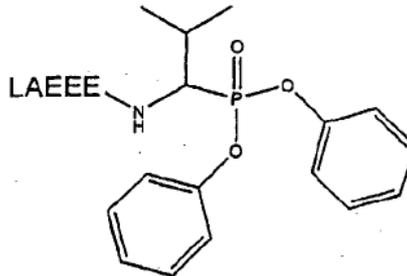
MATEKLWVTVYYGVVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTD 50  
 PNPQEVVLSCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNNKTFNGT 100  
 GPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGLSLAEEVVIRSVNFTDNAKTIIV 150  
 QLNTSVEINCTHCNISRAKWNNTLKQIASKLREQFGNNKTIIFKQSSGGD 200  
 PEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTEGSDTITLPC 250  
 RIKQIINMWQKVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNSNNESEIF 300  
 RPPGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKLDPNSSSVDKLAAAVV 350  
 HFFKNIIVTPRTPPPS 365

Se propone una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de la estructura anterior.

5 Se proporciona un método para la producción de un anticuerpo catalítico utilizando animales con patologías autoinmunes espontáneas e inducidas. El animal con patologías autoinmunes espontáneas e inducibles son ratones MRL-lpr/lpr, siendo los ratones inmunizados con un antígeno que contiene un hapteno, siendo el hapteno un conjugado de un inhibidor de la proteasa covalente que depende de un mecanismo con un péptido, siendo el péptido un fragmento de un sustrato potencial del anticuerpo catalítico.

El sustrato potencial del anticuerpo catalítico es gp120 o su fragmento.

El peptidilfosfonato tiene la siguiente estructura:



10

Breve descripción de los dibujos:

Figura 1. Secuencia de nucleótidos del **fragmento I-III de gp120**. Los fragmentos I, II y III, están coloreados de forma secuencial. Los cebadores utilizados en la PCR se señalan con letras mayúsculas.

Figura 2. Diagramas de proteínas recombinantes obtenidas con el uso del vector pET32b.

15 Figura 3. Diagramas de proteínas recombinantes obtenidas con el uso del vector pET28a.

Figura 4. Electroforetograma (A) e inmunotransferencia (B) de las diferentes etapas de aislamiento y purificación de la proteína **gp120I-IIImbp** (el producto del constructo 15). 1 - proteínas celulares totales antes de la inducción; 2 - proteínas celulares totales después de la inducción; 3 - la fracción de proteínas intracelulares solubles; 4 - proteínas solubles no retenidas por la columna quelante de metal; 5 - proteínas solubles eluidas a pH 5,0; 6 - preparación de una forma de proteína soluble después de purificación cromatográfica; 7 - la fracción de proteínas intracelulares insolubles; 8 - proteínas insolubles no retenidas por la columna quelante de metales; 9 - preparación de una forma de proteína desnaturalizada después de purificación cromatográfica; 10 - marcador.

Figura 5. Análisis de la especificidad antigénica de anticuerpos en suero de ratones SJL inmunizados con la proteína de fusión **gp120I-IIImbp** con diferentes dosis. La leyenda de la figura indica la dosis de inmunógeno; **SJL-2** son ratones inmunizados con la dosis de 150 µg por ratón, **SJL-3** son ratones inmunizados con la dosis de 300 µg por ratón.

Figura 6. Los principios de análisis de fluorescencia y enzimáticos de la actividad proteolítica.

Figura 7. Determinación de la actividad proteolítica de la preparación de anticuerpos aislados a partir de suero de ratones SJL inmunizados con la proteína de fusión **gp120I-IIImbp**. **SJL-1** son los ratones de control. **SJL-2** son los ratones inmunizados con la dosis de 150 µg por ratón. **SJL-3** son los ratones inmunizados con la dosis de 300 µg por ratón. BSA-FITC y gp120-FITC se utilizaron como sustratos.

5 Figura 8. Inhibición de la actividad proteolítica de la preparación de anticuerpos aislados a partir de suero de ratones **SJL** inmunizados con la proteína de fusión **gp120I-IIImbp**. **SJL-1** son los ratones de control.

**SJL-2** son los ratones inmunizados con la dosis de 150 µg por ratón.

AEBSF: fluoruro de aminoetanobencenosulfonilo.

CMC: fenilalanilclorometilcetona.

10 Figura 9. Inhibición de anticuerpos antiespecie de la actividad proteolítica de la preparación de anticuerpos aislados a partir de suero de ratones SJL inmunizados con **gp120I-IIImbp**. **SJL-1** son los ratones de control. **SJL-2** son los ratones inmunizados con la dosis de 150 µg por ratón.

Anti-IgG: anticuerpos policlonales de conejo contra IgG de murido.

15 Figura 10. Determinación enzimática de la actividad proteolítica de preparaciones de anticuerpos aislados a partir de sueros de ratones **SJL** inmunizados con las proteínas de fusión **gp120I-IIImbp** a diferentes dosis. A: **SJL-1** son los ratones de control; **SJL-2** son los ratones inmunizados con la dosis de 150 µg por ratón; **SJL-3** son los ratones inmunizados con la dosis de 300 µg por ratón; **CBA** son ratones de control CBA.

20 Figura 11. Los cambios en el nivel de expresión de marcadores de superficie de las células T del sistema inmune de los ratones SJL inmunizados con la proteína de fusión **gp120I-IIImbp** a diferentes dosis, con la proteína recombinante **gp120I-III**, y con el péptido encefalitogénico **MBP<sub>89-104</sub>**. **SJL-1** son los ratones no inmunizados. **SJL-2** son los ratones inmunizados con **gp120I-IIImbp** con la dosis de 150 µg por ratón. **SJL-3**: ratones inmunizados con **gp120I-IIImbp** con la dosis de 300 µg por ratón. **SJL-4** son ratones inmunizados con el péptido **MBP<sub>89-104</sub>**. **SJL-5** son los ratones inmunizados con la proteína recombinante **gp120I-III** con la dosis de 300 µg por ratón.

25 Figura 12. Inmunoensayo enzimático de los sueros de ratones **SJL**, **MRL-lpr/lpr** y **NZB/NZW F1** inmunizados con peptidilfosfonato. El antígeno utilizado fue: A - péptido reactivo biotinilado; B - difenilvalilfosfonato biotinilado; C - metil p-nitrofenil biotinilfenilmetilfosfonato.

Figura 13. Electroforetograma (A) e inmunotransferencia (B) de anticuerpos policlonales aislados de los ratones inmunizados de cepas de ratones **SJL** (4), **MRL-lpr/lpr** (5) y **NZB/NZW F1** (6) y modificados covalentemente con un antígeno. Carriles 1 - 3: 10 µg de BSA, 1 µg de tripsina, y 1 µg de IgG de ratones BALB/c.

30 La presente invención se ilustra mediante los siguientes Ejemplos:

**Ejemplo 1.** Desarrollo de un constructo genético que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión **gp120I-IIImbp** para su expresión en un sistema procarionta.

35 1) Para inducir la encefalomiyelitis autoinmune (EAE) en ratones **SJL**, se escogió el péptido 89 - 104 de la proteína básica de mielina (MBP), teniendo el péptido la siguiente composición: **VVHFFKNIVTPRTPPPS** [Sakai, K., Zamvil, S. S., Mitchell, D. J., Lim, M. Rothbard, J. B., y Steinman, L. 1988. Characterization of a major encephalitogenic T cell epitope in SJL/J mice with synthetic oligopeptides of myelin basic protein. J. Neuroimmunol. 19:21-32, // Tan, L. J., Kennedy, M. K., y Miller, S. D. 1992. Regulation of the effector stages of experimental autoimmune encephalomyelitis via neuroantigen-specific tolerance induction. // Fine specificity of effector T cell inhibition. J. Immunol. 148: 2748 - 2755]. La secuencia de ADN correspondiente a dicho péptido se sintetizó por medio de PCR a partir de dos oligonucleótidos que se superponen que contienen adicionalmente un codón de detención y sitios de restricción. Se clonó el fragmento de ADN resultante en el plásmido pET32b utilizando las restrictasas NotI y XhoI. El plásmido resultante es denominado en lo sucesivo **pET32mbp**. Para la identificación precisa de proteínas recombinantes en todas las etapas de su expresión, aislamiento y purificación, se modificaron por ingeniería genética los constructos **pET32bCH** y **pET32CHmbp** para contener una secuencia que codifica para el epítipo 40 inmunodominante de 10 aminoácidos de longitud de la proteína humana **p62 c-myc** [Evan G. I., Lewis G. K., Ramsay G., Bishop J. M., // Mol. Cell. Biol.. 1985, V. 5 (12), páginas 3610 - 3616.].

2) Numerosas publicaciones disponibles sobre la estructura, la inmunogenicidad y la actividad funcional de la proteína de superficie gp120 [Hansen, J. E., Lund, O., Nielsen, J. O., Brunak, S., y Hansen, J.-E., S. 1996. Prediction of the secondary structure of HIV-1 gp120. Proteins. 25: 1-11 // Shioda, T., Oka, S., Xin, X., Liu, H., Harukuni, R.,

- Kurotani, A., Fukushima, M. Hasan, MK, Shiino, T., Takebe, Y., Iwamoto, A. y Nagai, Y. 1997. In vivo sequence variability of human immunodeficiency virus type 1 envelope gp 120: association of V2 extension with slow disease progression. *J. Virol.* 71: 4871 - 4881 // Sullivan, N., Sun, Y., Sattentau, Q., Thali, M., Wu, D., Denisova, G., Gershoni, J. Robinson, J., Moore, J. , y Sodroski, J. 1998. CD4-Induced Conformational Changes in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Glycoprotein: Consequences for Virus Entry and Neutralization. *J. Virol.* 72: 4694 - 4703] permitieron la asignación de las regiones de proteínas que tienen una secuencia relativamente constante y más prometidas con respecto a la inmunización. Para trabajo adicional, se eligió un polipéptido quimérico, que consistía de tres fragmentos de **gp120** (designados como I, II y III) que carecen de la primera, segunda y tercera regiones hipervariables. Se utilizó la secuencia del gen **HXB2-env** como la plantilla inicial para la síntesis de este constructo [Page, K. A., Landau, N. R., y Littman, D. R. 1990. Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. *J. Virol.* 64: 5270 - 5276]. Se obtuvieron los fragmentos I, II y III por PCR utilizando oligonucleótidos sintéticos seguido por el ensamblaje de los fragmentos utilizando el enfoque de "empalme por extensión de solapamiento" (FIG. 1). El producto final **I-III** de la PCR y los productos intermedios **I-II**, **II-III** y **III** se clonaron en el plásmido **BlueScript**, con la subsiguiente nueva clonación en los plásmidos **pET32b** (FIG. 2: No. 8, 9, 10 y 12), **pET32mbp** (FIG. 2: No. 5), **pET32bCH** (FIG. 2: No. 6 y 11) y **pET32CHmbp** (FIG. 2: No. 7) usando las restrictasas respectivas, es decir, NcoI-BamHI para **I-III**, NcoI-NotI para **I-II**, EcoRV-BamHI para **II-III**, y EcoRV/DraI.-BamHI para **III**. Los productos de estos constructos se utilizaron para analizar la actividad proteolítica de los anticuerpos contra la gp120 que habían sido obtenidos como resultado de la inmunización.
- Para la inmunización de ratones **SJL**, con el fin de obtener anticuerpos proteolíticos contra la glicoproteína **gp120** proteolíticas, se modificó por ingeniería genética el constructo final basado en el vector **pET28a** (FIG. 3: No. 15). El fragmento NcoI-XhoI del constructo 7 se volvió a clonar en pET28a en los sitios de restricción respectivos. Para analizar la respuesta inmune, se obtuvo en forma similar un constructo adicional con base en el vector **pET28a** (FIG. 3: No. 13) y que comprende el gen de gp120I-III, pero no secuencias que codifican el péptido mbp y el epítipo de c-myc.

La preparación de células electrocompetentes, transformación, tratamiento con restrictasa, ligación, PCR, y electroforesis de ADN se llevaron a cabo de acuerdo con métodos estándar [Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989].

**Ejemplo 2.** Expresión, aislamiento y purificación de la proteína de fusión gp120I-III-mbp.

- La proteína de fusión se expresó en células de *E. coli* lisogenizadas con T7 (se utilizó la cepa BL21 (DE3) en el presente ejemplo). La proteína se expresó de la siguiente manera:
1. Las células competentes se transforman con 0,1 µg de plásmido de acuerdo con el punto 3 del Ejemplo 1 por medio de electroporación y se siembran en una placa de Petri que contiene 30 µg / ml de kanamicina y 2% de glucosa. Las colonias bacterianas se desarrollan durante 12 - 14 horas a 30 °C.
  2. Las colonias se suspenden completamente en 11 medios bacterianos 2xYT que contienen 30 mg / ml de kanamicina y 0,1% de glucosa.
  3. El cultivo de células se desarrolla a 30°C bajo aireación adecuada hasta una densidad de 0,6 - 1 OU pero no más de tres horas; a continuación, se añade IPTG hasta alcanzar 1 mM y se lleva a cabo la inducción durante 3 horas a 30 °C.
- Aislamiento y purificación de proteínas de fusión
- Se aisló la proteína de fusión gp120I-III-mbp bajo condiciones desnaturizantes de la siguiente manera:
1. El cultivo celular se centrifuga a temperatura ambiente durante 10 min a 5000 rpm; se suspende el sedimento en 1/50 del volumen inicial en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; se añaden lisozima y Triton-X100 hasta alcanzar 0,1 mg / ml y 0,1%, respectivamente; y se incuba la mezcla durante 30 min a 30 °C.
  2. Se enfría el lisado a 0 °C, se lo somete a sonicación hasta la desaparición de la viscosidad, y se centrifuga durante 40 min a 20.000 rpm.
  3. Se suspende cuidadosamente el sedimento en 1/200 del volumen inicial en un amortiguador que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA-Na 1 mM, y 1% de Nonidet P-40, se centrifuga durante 40 min a 20.000 rpm, se resuspende en amortiguador cromatográfico A y se centrifuga bajo las mismas condiciones.
  4. Se suspende el sedimento en amortiguador cromatográfico A (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, y urea

6 M, pH 8,0), se incuba sobre hielo durante 1 h, y se centrifuga durante 10 min a 20.000 rpm.

5 5. Se aplica el sobrenadante a una columna quelante de metal equilibrada con amortiguador A a razón de 10 volúmenes de columna por hora, y se lava la columna con amortiguador B ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, y urea 6 M, pH 7,0) a razón de 30 volúmenes de columna por hora hasta la discontinuación de la migración de la línea base.

6. La elución se lleva a cabo con amortiguador B ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, MES - NaOH 20 mM, NaCl 300 mM, y urea 6 M, pH 5,0) a razón de 30 volúmenes de columna por hora, después de lo cual se equilibra la columna con amortiguador A por segunda vez, y se inmovilizan los iones metálicos y se remueven las proteínas retenidas con amortiguador A que contiene EDTA 100 mM, pH 8,0.

10 7. Se analizan las fracciones de eluato por electroforesis en gel y se combinan, y se precipitan las proteínas por diálisis contra agua desionizada a temperatura ambiente.

8. El precipitado de proteína se separa por centrifugación a 4.000 rpm durante 10 min, se lava con etanol al 70%, se suspende en un volumen mínimo de etanol al 70%, se somete a sonicación hasta que termina la sedimentación de partículas, y se almacena en forma de suspensión a +4 °C en tubos de polipropileno estériles.

15 Análisis de la proteína de fusión

Para confirmar la identidad y la pureza de las preparaciones resultantes de la proteína de fusión gp120I-IIImbp, se determinaron las siguientes características de la proteína:

1. Se determinó la pureza electroforética de la proteína por el Método 1 y se encontró que era del 97%.

20 2. Se determinó la inmunorreactividad con anticuerpos contra el epítipo c-myc por el Método 2, y se encontró que la proteína era inmunorreactiva.

3. Se determinó el peso molecular (Da) por espectrometría de masas mediante el Método 3 y se encontró que era de 42307 Da, estando el valor calculado de 42.075 dentro del error tolerado de  $\pm 2,5\%$ .

4. Se determinó la absorción específica de la proteína (%) por el absorbente de quelato metálico mediante el Método 4 y se encontró que era  $> 95\%$ .

25 Métodos de análisis:

1. Densitometría del electroforegrama.

30 La electroforesis desnaturizante de proteínas se llevó a cabo de acuerdo con Laemmli usando solución de urea 6 M en los geles de concentración y fraccionamiento. Se llevó a cabo la coloración del gel con Azul de Coomassie R-250 mediante la mejora del contraste con una sal de cobre. Se llevó a cabo la densitometría con un densitómetro o un escáner de placa asistido por ordenador, con la posterior digitalización y análisis del electroforegrama (FIG. 4A).

1. Se prepara un gel de dos componentes con la siguiente composición:

Gel superior: 6,66% de acrilamida / bis-acrilamida en una relación de 29/1, dodecil sulfato de sodio al 0,1%, Tris-HCl, 0,125 M y urea 6 M, pH 6,8.

35 Gel inferior: 10% de acrilamida / bis-acrilamida en una relación de 29/1, dodecil sulfato de sodio al 0,1%, Tris-HCl 0,375 M, y urea 6 M, pH 8,9.

2. Las muestras de proteína se mezclan con amortiguador de la muestra que contiene 5% de 2-mercaptoetanol, se calienta durante 5 min a 100°C y se aplica a los geles. La electroforesis se lleva a cabo a 25 mA hasta que se eluye el colorante indicador.

40 3. Se separa e incuba el gel de fraccionamiento durante 5 min en una mezcla caliente de etanol al 10% y ácido acético al 10%.

4. La coloración se lleva a cabo por incubación de gel durante 10 minutos en una mezcla caliente de la siguiente composición: 15% de etanol, 25% de ácido acético, 0,3 g / l de azul de Coomassie R-250, y 0,45 g / l de sulfato de cobre hexahidratado.

5. Después de la coloración, se somete el gel a múltiples lavados, como se describe en el punto 3, hasta decoloración completa.

5 6. El gel se somete a densitometría de acuerdo con las especificaciones del densitómetro. Tras la digitalización del electroforegrama con un escáner de la placa asistido por ordenador, se utiliza el canal verde de imagen de color o se usa el filtro de la luz verde del escáner. Se analiza la imagen del electroforegrama utilizando el software Scion Image por el método Surface Plot. La pureza de la preparación se define como la relación entre el pico principal con respecto a la suma de todos los picos detectados.

2. Inmunotransferencia.

10 Se lleva a cabo la inmunotransferencia de acuerdo con el régimen estándar utilizando una solución de bloqueo de BSA. El amortiguador de hibridación se complementa con albúmina de suero bovino (fracción V) hasta alcanzar el 0,5% (FIG. 4C).

1. La electroforesis se lleva a cabo de acuerdo con el Método 2 utilizando un marcador de coloración previa.

15 2. El gel de fraccionamiento se separa, después de lo cual se realiza el procedimiento de transferencia a una membrana HybondN+ (Amersham) utilizando un aparato LKB para electrotransferencia semiseca de acuerdo con las especificaciones del fabricante durante 40 minutos a 0,8 mA / cm<sup>2</sup>.

3. Se bloquea la membrana durante 1 h con la solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM y 5% de albúmina de suero bovino (fracción V).

20 4. La membrana se lava tres veces durante 5 min con una solución de desbloqueo que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM y 0,05% de Tween-20. A continuación, se lleva a cabo la hibridación con el anticuerpo monoclonal 1-9E10.2 durante 1 h en la solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM y 0,5% de albúmina de suero bovino.

5. Se realiza el desbloqueo (lavado) de acuerdo con el punto 4, y se hibrida la membrana con anticuerpos secundarios IgG antirratón específicos de Fc de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma Immunochemicals) en las mismas condiciones que las descritas en el punto 4.

25 6. Se desbloquea la membrana como se describe en el punto 4 y se tiñe con la solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), 3 mg / ml de 1-cloro-4-naftol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,003% durante 30 min.

30 Todos los análisis se realizan utilizando títulos de anticuerpos primarios y secundarios de 1:10000 y 1:4000, respectivamente, tal como se determina con un antígeno caracterizado, y se aplica una proteína de ensayo para electroforesis con una dosis de 0,1 µg. La presencia de un posible inmunorreactividad de la proteína de ensayo se determina visualmente por medio de los siguientes criterios: el desarrollo de una única zona de coloración inconfundible bien perfilada cuya movilidad electroforética corresponde a aquella de la proteína de ensayo. Cuando se cumplen estos criterios, se lleva a cabo el análisis instrumental.

35 Para el análisis semicuantitativo final, se lleva a cabo la evaluación densitométrica de la intensidad de la zona de tinción por el método Surface Plot usando el software Scion Image. Los resultados del ensayo se consideran positivos cuando la altura media del pico es 5 veces mayor que el rango de las fluctuaciones de línea de base sobre la densitograma.

3. Espectrometría de masas MALDI.

Las muestras se preparan para el análisis de la siguiente manera.

40 1. Una parte alícuota de la suspensión de proteína de un volumen mínimo se evapora hasta sequedad en una centrífuga de vacío.

2. El residuo se disuelve en 1 - 5 µl de la mezcla de ácido trifluoroacético acuoso al 1% y acetonitrilo al 30%, se aplica a la placa base utilizando ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) como matriz, y se analiza.

45 3. Un espectrómetro de masas con MALDI TOF, similar en desempeño al aparato VISION 2000, se calibra previamente para los estándares de referencia de proteínas (tripsina y angiotensina), y se leen los espectros de masas de proteína usando calibración interna. Las masas de los iones moleculares se determinan utilizando el software del analizador de masas de VISION 2000 teniendo en cuenta las calibraciones realizadas.

4. Adsorción específica.

Para confirmar las propiedades funcionales de una preparación de proteína, se analiza cualitativamente la adsorción de la solución por medio del exceso de absorbente de quelato metálico. Las proteínas analizadas que tienen la secuencia 6xHis serán inmovilizadas por el adsorbente de quelato metálico a pH 8,0.

- 5 1. Se equilibra el volumen requerido del absorbente de quelato metálico Talon (Clontech Laboratories Inc.) con una solución amortiguadora ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, Triton X-100 al 0,1%) y se transfieren a tubos de ensayo porciones de 20  $\mu\text{l}$  de la suspensión 1 : 1.
- 10 2. Se añaden 10  $\mu\text{g}$  de solución de la proteína del ensayo, y se ajusta el volumen a 100  $\mu\text{l}$  con amortiguador de acuerdo con el punto 1. Los tubos de ensayo se incuban con agitación durante 15 min y se dejaron reposar, después de lo cual se toman alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  para el análisis.
3. Se considera que la adsorción es completa si la concentración de proteína medida en la muestra de ensayo no excede de 0.005  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (es decir, no es significativamente diferente del control cuando la concentración de proteína se determina por medio del ensayo de BSA), que corresponde al nivel de absorción del 95%.

**Ejemplo 3.** Inmunización de ratones SJL autoinmunes con la proteína de fusión gp120I-III<sub>mbp</sub>.

- 15 Se inmunizan ratones **SJL** con la proteína de fusión gp120 I-III-mbp de la siguiente forma.
1. Se inmunizaron cinco ratones SJL hembra de 6 - 8 semanas de edad dos veces en un intervalo de una semana con el antígeno en adyuvante completo de Freund que tiene la concentración final de *M. tuberculosis* de 2 mg / ml y las concentraciones de antígeno de 1,5 mg / ml y 3 mg / ml.
- 20 2. Se aplicaron inyecciones de un volumen total de 0,1 ml de la preparación por vía subcutánea en tres sitios a lo largo de la parte posterior en el caso de la primera inmunización, y en las patas, en el caso de la segunda inmunización.
3. Para comprometer la barrera hematoencefálica, un día antes de la primera inmunización y dos días después de la misma, se inyectan adicionalmente los ratones en forma intraperitoneal con 400 ng de preparación de la toxina pertussis.
- 25 4. Diecisiete días después de la primera inmunización, los ratones reciben una inyección peritoneal de refuerzo del antígeno en PBS en un volumen total que asciende a 0,2 ml, siendo la dosis de la proteína inmunogénica de 50  $\mu\text{g}$  por ratón.
5. Al mismo tiempo con el procedimiento de refuerzo, se toma sangre del seno orbital de los ratones experimentales y de control (no inmunizados) para controlar el desarrollo de la respuesta inmune. La presencia de anticuerpos específicos en el suero se determina mediante un inmunoensayo enzimático.
- 30 6. Veintiún días después del comienzo del experimento, se utilizan los ratones que muestran la respuesta máxima específica al antígeno en ensayos inmunoquímicos para esplenectomía y toma de muestras de sangre. Los bazo se utilizan para fusión celular con el fin de obtener clones de hibridoma y para el aislamiento de ARNm para la clonación subsiguiente como bibliotecas de presentación en fagos.
- 35 Para confirmar la aparición de anticuerpos proteolíticos específicos del antígeno en el curso de la inmunización realizada contra el trasfondo de la patología autoinmune inducida manifestada como encefalomiелitis autoinmune experimental preclínica, se llevan a cabo los siguientes ensayos:
- Análisis de la especificidad del antígeno y la actividad proteolítica de las preparaciones obtenidas de anticuerpos policlonales
- 40 1. Análisis de la especificidad antigénica de las preparaciones obtenidas de anticuerpos.
- Para el control comparativo inicial de la respuesta inmune específica al antígeno en varios ratones inmunizados, se utiliza un inmunoensayo enzimático (EIA) (FIG. 5).
- Se inmoviliza un antígeno sobre una placa inmunológica y, después de la incubación con sueros obtenidos de ratones inmunizados y de control, se detecta el complejo antígeno - anticuerpo con anticuerpos IgG anti-ratón de conejo específicos de Fc conjugados con peroxidasa de rábano picante. Los sueros de los ratones inmunizados y de
- 45

control se utilizan en varias diluciones (1:12 y 1:48). Las siguientes proteínas recombinantes se utilizan como antígenos:

- 1) **trx-gp120 I-III-CH**, una proteína de fusión que comprende tiorredoxina A de *E. coli*, una secuencia de gp120 que carece de la primera, segunda y tercera regiones variables, y la secuencia de His<sub>6</sub>-c-myc;
- 5 2) **trx-gp120 I-II-H**, una proteína de fusión que comprende tiorredoxina A de *E. coli*, las secuencias de la primera y segunda regiones constantes de la gp120, y la secuencia de His<sub>6</sub>;
- 3) **trx-gp120 II-III-H**, una proteína de fusión que comprende tiorredoxina A de *E. coli*, la secuencia de las segundas regiones constantes de gp120, con el terminal C de la secuencia a partir de la tercera región constante, y la secuencia de His<sub>6</sub>;
- 10 4) **trx-gp120 III-H**, una proteína de fusión que comprende tiorredoxina A de *E. coli*, el terminal C de la secuencia de gp120 a partir de la tercera región constante, y la secuencia de His<sub>6</sub>; y
- 5) **trx-CH**, una proteína de fusión que comprende tiorredoxina A de *E. coli* y la secuencia de His<sub>6</sub>, que se utilizó como el control negativo para determinar el enlazamiento no específico de los anticuerpos obtenidos a estas secuencias de proteínas.
- 15 Como resultado de los experimentos realizados (FIG. 5), se ha demostrado que todas las preparaciones de anticuerpos obtenidos a partir del suero de los ratones inmunizados con una proteína de fusión que interactúan con el antígeno.

2) Análisis de la actividad proteolítica de las preparaciones obtenidas de anticuerpos policlonales.

- 20 Para determinar la actividad proteolítica, los anticuerpos son, en primer lugar, purificados por cromatografía de afinidad usando proteína G recombinante inmovilizada sobre Sefarosa. La actividad se detecta por dos métodos diferentes (FIG. 6).

- 25 A. Ensayo de fluorescencia. El principio del método, que se expone en la FIG. 6A, se basa en el fenómeno de la extinción de la fluorescencia por una proteína fuertemente marcada con un fluoróforo, fenómeno que se describe en la literatura y se basa principalmente en las interacciones mutuas de los anillos aromáticos de diferentes moléculas de fluoróforo (por ejemplo, debido a los intensos contactos hidrófobo y de apilamiento), y en el aumento de la fluorescencia por la introducción de rompimientos en la cadena del polipéptido. En el presente ensayo, se utilizaron albúmina de suero bovino y la proteína recombinante **trx-gp120 I-III-CH** excesivamente marcada con isotiocianato de fluoresceína (designada en lo sucesivo como **BSA-FITC** y **gp120-FITC**) como los sustratos para la proteólisis. La reacción se controló por el aumento en la fluorescencia frente al control. Se utilizó tripsina desprovista de la actividad contaminante de la quimotripsina como el modelo de proteasa para determinar la sensibilidad del método y para evaluar los cambios temporales de señal en función de las cantidades de sustrato y de enzima.
- 30

Para determinar la actividad proteolítica de las preparaciones analizadas de anticuerpos, se llevan a cabo mediciones por triplicado en la línea base y después de incubación a 37 °C durante 24 h y 48 h. Los resultados de estos experimentos sugieren lo siguiente (FIGS. 7 - 9):

- 35 • En primer lugar, la actividad proteolítica de preparaciones obtenidas a partir de ratones inmunizados con la proteína **gp120 I-III-mbp** se incrementa en comparación con los ratones **SJL** de control cuando se utilizan ambos sustratos.
- En segundo lugar, el aumento en la actividad proteolítica específica del antígeno es predominantemente responsable del aumento total. Con gp120-FITC, se incrementó la señal de diez a veinte veces en comparación con los ratones no inmunizados, mientras que con BSA-FITC, la señal sólo se incrementó dos veces.
- 40 • En tercer lugar, el mecanismo predominante es, en este caso, la catálisis que depende de la serina, debido a que la adición de inhibidores irreversibles reactivos con la serina resultó en una reducción significativa en la tasa observada de hidrólisis de BSA-FITC.
- En cuarto lugar, las moléculas de IgG, que se remueven de forma selectiva de la reacción mediante inmunoprecipitación, son responsables por, al menos, una parte importante de la actividad proteolítica observada.
- 45

Junto con indiscutibles ventajas, tales como una alta sensibilidad y la simplicidad y la rapidez de las mediciones,

este método, por desgracia, tiene algunos inconvenientes, el principal de los cuales es la compleja relación no lineal entre los cambios de fluorescencia y el sustrato y las cantidades de enzima, el volumen de la muestra, la composición del amortiguador y el pH, etc., lo que resulta en dificultades en la evaluación cuantitativa y la caracterización de la actividad enzimática de las preparaciones de anticuerpos policlonales. Además de eso, la determinación de la actividad proteolítica por medio de este ensayo requiere de un gran exceso de sustrato vs. enzima, debido a que la cantidad real de abzymas en el conjunto total de anticuerpos puede hacer algunos porcentajes o menos.

Con respecto a lo anterior, se usó como alternativa otro método para la determinación de la actividad proteolítica de las preparaciones de anticuerpos obtenidos.

## 10 B. Ensayo enzimático.

El principio de este método de detección de la actividad proteolítica, que se describe en la figura. 6B, se basa en el uso de pequeñas cantidades (aproximadamente 1 ng por reacción) de una enzima ribonucleasa A altamente activa como el sustrato de la reacción de proteólisis. El nivel de actividad de la ribonucleasa, que depende linealmente de la concentración de ARNasa A activa, se determina por medio del método del residuo soluble en ácido usando ácido policitidílico como el sustrato polimérico de la reacción. Este método de detección de la actividad proteolítica presumiblemente permite el logro de un exceso molar significativo de enzima vs. el sustrato y por lo tanto hace las condiciones de la reacción de proteólisis en estudio más próximas a las del modelo de cinética no estacionaria bien estudiado ( $[S]_0 \ll [E]$ ).

Para eliminar posibles artefactos, se analizaron todas las preparaciones de anticuerpos bajo estudio para determinar la actividad intrínseca de la ribonucleasa y la presencia de componentes de la solución que alteran en forma no enzimática la actividad de la ribonucleasa añadida. Todas las preparaciones de anticuerpos bajo estudio estaban desprovistas de la actividad intrínseca de ribonucleasa y no alteraron la actividad adicional de la ribonucleasa después de un corto período de incubación (10 min) de la reacción.

La actividad proteolítica de las preparaciones de anticuerpos analizadas se midió bajo las siguientes condiciones: concentración de IgG 0,1 mg / ml, tiempo de incubación 17 h, temperatura 37 °C. La actividad de la preparación medida por este método se expresó como la velocidad de hidrólisis de la ribonucleasa.

Los resultados del ensayo presentados en la FIG. 10 muestran que la actividad proteolítica disminuyó 1,5 - 2 veces tras la inmunización de los ratones con gp120-I-III-MBP. Estos resultados están en una correspondencia limitada con los resultados del ensayo de fluorescencia: sólo se reproduce la correlación negativa entre la actividad proteolítica y la dosis de inmunógeno utilizada para la inmunización. La discrepancia entre los resultados del análisis fluorescente y enzimático podría explicarse por las diferencias entre las estructuras de los sustratos de la proteólisis. Presumiblemente, un glóbulo de ARNasa A en comparación con un glóbulo de BSA tiene un menor número de sitios disponibles para las proteasas y las abzymas. Dado que, tras la inmunización, la concentración total en suero de IgG se incrementa varias veces por anticuerpos específicos del antígeno, la proporción de los anticuerpos proteolíticos iniciales disminuye, mientras que los anticuerpos proteolíticos específicos del antígeno recientemente formados son, más probablemente, catalizadores ineficientes de escisión proteolítica de ARNasa A.

## 3. Seguimiento del desarrollo de la respuesta inmune e inducción experimental de encefalomiелitis autoinmune.

Para caracterizar las características de desarrollo de la respuesta inmune tras la inmunización con una proteína de fusión que comprende el neuroantígeno MBP, se llevó a cabo un análisis comparativo de la expresión de los marcadores de superficie específicos en linfocitos T de ratones SJL que no fueron inmunizados (control), a partir de ratones inmunizados con el péptido sintético MBP<sub>89-104</sub>, proteína recombinante de fusión gp120I-IIImbp a dos dosis diferentes y proteína recombinante gp120I-III (Figura 11). Todas las inmunizaciones se realizaron en paralelo bajo condiciones idénticas como se describió anteriormente. Veintiún días después del inicio de un experimento, se analizaron linfocitos T CD4+ aislados a partir de dos ratones de cada grupo por citometría de flujo. Una característica específica de los ratones SJL fueron recuentos inicialmente bajos de células T CD8+. Además, se han estudiado los cambios en la expresión de los siguientes marcadores de superficie importantes para el desarrollo de la respuesta inmune: CD11a, CD44, CD45RB, y CD62-L. Los resultados presentados en la FIG. 11 sugieren que en el caso de la inmunización con el péptido MBP y, también, con las proteínas de fusión que contienen este antígeno, se indujo una respuesta inmune de células T plenamente desarrolladas (parecidas a células de memoria) en ratones el día 21 después de la inmunización, mientras que en caso del uso únicamente de gp120I-III como el antígeno, se continuó desarrollando la respuesta inmune. Los datos obtenidos proporcionan una evidencia del mejoramiento del desarrollo de la respuesta inmune cuando se utiliza el autoantígeno MBP y de la activación de los linfocitos T típicos del desarrollo de encefalomiелitis autoinmune experimental.

Por lo tanto, el Ejemplo anterior muestra que, tras la inmunización de ratones SJL con la proteína de fusión **gp120I-IIImbp**, se generan anticuerpos proteolíticos específicos del antígeno contra el fondo de la fase preclínica de la

encefalomielitis autoinmune experimental inducida.

**Ejemplo 4.** Síntesis del derivado reactivo de fosfonato del fragmento de péptido de gp120.

En la primera etapa, se sintetizan aminoalquilfosfonatos protegidos en su grupo amino libre en la reacción de co-  
condensación de trifenilfosfito, isobutanal y bencilcarbamato. Para este fin, se agita la mezcla de trifenilfosfito,  
5 isobutanal, y bencilcarbamato, 0,1 moles de cada uno, en 15 ml de ácido acético glacial durante aproximadamente 1  
h hasta que se interrumpe la generación de calor. Después de eso, se agita la reacción con calentamiento a 80 °C  
durante 1 h. Después de la realización completa de la reacción, se removieron los productos volátiles con un  
evaporador rotatorio a presión reducida y calentamiento en un baño de agua. El residuo oleoso se disuelve en  
10 metanol (180 ml) y se deja cristalizar a -20 °C durante 3 h. Después de la cristalización, se recoge el residuo de  
difenil 1 - (N-benciloxicarbonil)-aminoalquilfosfonato por filtración y se recristaliza en un volumen mínimo de  
cloroformo (30 - 40 ml) seguido por la adición de cuatro volúmenes de metanol.

Para obtener aminoalquilfosfonato libre, se remueve el grupo protector por tratamiento del difenil 1-(N-bencilcarbonil)  
-aminoalquilfosfonato con una solución al 33% de bromuro de hidrógeno en ácido acético (15 ml por 0,1 moles)  
15 durante 1 h a temperatura ambiente. Se remueven los componentes volátiles con un evaporador rotatorio a presión  
reducida y calentamiento en un baño de agua. Se cristaliza el bromhidrato de 1 - (N-benciloxicarbonil)-  
aminoalquilfosfonato a partir del residuo resultante por adición de éter dietílico anhidro. Se obtiene fosfonato libre al  
pasar amonio gaseoso seco a través de una suspensión de bromhidrato de fosfonato en éter dietílico hasta que se  
descontinúa la formación de un precipitado espeso de bromuro de amonio y se observa la floración completa de la  
20 suspensión. Se remueve el bromuro de amonio resultante por filtración, y se evapora el éter dietílico en un baño de  
agua a presión atmosférica.

Para obtener el compuesto Leu-Ala-Glu-Glu-Glu-Val-<sup>P</sup> (OPh)<sub>2</sub> (LAEEEEV-<sup>P</sup> (OPh)<sub>2</sub>), donde <sup>P</sup> (OPh)<sub>2</sub> significa la  
sustitución del grupo carboxílico α con difenilfosfonato, se sintetiza primero el péptido Boc-Val-Ala-(t-Bu) Glu-(t-Bu)  
25 Glu-(t-Bu) Glu protegido en su grupo amino terminal N y los grupos secundarios. El péptido Boc-Val-Ala-(t-Bu) Glu-(t-  
Bu) Glu-(t-Bu) Glu se fusiona con el derivado fosfonato de valina mediante la mezcla de 2 μmoles del péptido  
protegido, 2 μmoles del fosfonato, y 2 μmoles de dicitclohexilcarbodiimida en 300 μl de acetonitrilo y se incuba  
durante 1 h. Después de la finalización de la reacción, se separaron sus productos por HPLC en fase inversa en una  
columna NovaPak C18 de 150 x 3,9 mm de Waters usando un gradiente de 0% a 80% de acetonitrilo en fosfato de  
30 potasio 20 mM (pH 7,0). Las fracciones resultantes se analizan por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Las  
fracciones que contienen sustancias con masas de iones moleculares de 1145 Da ([M + H]<sup>+</sup>), 1167 Da ([M + Na]<sup>+</sup>) o  
1183 Da ([M + K]<sup>+</sup>) se combinan y se liofilizan. El residuo se disuelve en 100 μl de ácido trifluoroacético al 100% y se  
incuba durante 1 h a temperatura ambiente para remover los grupos de protección tert-butilo y tert-butiloxicarbonilo.  
Se precipita el peptidilfosfonato desbloqueado por medio de la adición de 10 volúmenes de éter dietílico anhidro a la  
reacción. Se separa el precipitado mediante centrifugación durante 10 min a 12.500 rpm, y se repite el procedimiento  
de desbloqueo. Se seca el residuo al aire y se almacena a -20°C.

35 **Análisis del peptidilfosfonato LAEEEEV-<sup>P</sup> (OPh)<sub>2</sub>**

I. Espectrometría de masas por MALDI TOF.

1. Se aplica una cantidad mínima de peptidilfosfonato seco, al cual se le añaden 5 μl de acetonitrilo, a una placa  
base utilizando ácido fuerte acuoso libre de ácido 2,5-dihidroxi benzoico (DHB) como la matriz, y se lleva a cabo  
el análisis.
- 40 2. Se calibra previamente un espectrómetro de masas con MALDI TOF equivalente al aparato VISION 2000 con  
estándares de referencia dentro del rango de m/z de 500 - 2000 Da, y se obtienen los espectros de masas de  
las muestras de ensayo utilizando calibración interna. Se determinan las masas de iones moleculares utilizando  
el software de analizador de masas del VISION 2000 tenido en cuenta la calibración. El resultado esperado del  
análisis es la presencia de picos correspondientes a masas de 877.36, 900.34 y 915.45 ± 1 Da.

45 II. HPLC analítica de fase inversa.

1. A una muestra de 0,2 mg de peptidilfosfonato, se le añade 100 μl de amortiguador de fosfato de potasio 20  
mM (pH 7,0) que contiene acetonitrilo al 20%.
2. Se administra la muestra resultante en un inyector, y se lleva a cabo la elución por gradiente utilizando una  
columna NovaPak C18 de 150 x 3,9 mm de Waters para HPLC en fase reversa bajo las siguientes condiciones:
- 50 • el amortiguador A es acetonitrilo al 20% y fosfato de potasio 20 mM, pH 7,0;

- el amortiguador B es acetonitrilo al 80% y fosfato de potasio 20 mM, pH 7,0;
- la velocidad de elución es de 1,0 ml / min con un gradiente lineal de 100% de A hasta un gradiente de 100% de B durante 20 min seguido por 100% de B durante 10 min; y
- se registran los cromatogramas a una longitud de onda de 260 nm.

5 3. Los picos se integran sin corrección para la línea base. Se determina el tiempo de retención del pico principal, que tiene el área máxima, y se calcula la relación entre el área del pico principal con respecto a la suma de todas las áreas de los picos. El resultado esperado: el tiempo de retención es de 14,75 - 15,25 min; la pureza cromatográfica es > 95%.

### III. Inhibición de la actividad esterolítica de la quimotripsina.

10 1. Se prepara una solución de 0,5 ml 1  $\mu$ M de  $\alpha$ -quimotripsina en un amortiguador que contiene HEPES 0,1 M y NaCl 0,5 M, pH 7,2. La solución se divide en nueve alícuotas de 50  $\mu$ l, y se descarta el residuo.

2. Se preparan ocho diluciones del peptidilfosfonato del ensayo en acetonitrilo en un intervalo de 1000  $\mu$ l a 1  $\mu$ l.

3. A cada una de las primeras ocho alícuotas de la solución de enzima se les añade 5  $\mu$ l de la solución correspondiente de peptidilfosfonato, y se añaden 5  $\mu$ l de acetonitrilo a la novena parte alícuota.

15 4. Las muestras se incuban durante 1 h a  $25 \pm 5$  °C.

5. Las muestras se transfieren sucesivamente a una celda de espectrofotómetro que contiene 450  $\mu$ l de agua desionizada, se mezcla, después de lo cual se añaden 10  $\mu$ l de solución de acetato de p-nitrofenilo en metanol (2,5 mg / ml), después de lo cual se registra el aumento en la densidad óptica a una longitud de onda de 400 nm. La velocidad inicial de la hidrólisis del sustrato se calcula en unidades arbitrarias.

20 6. Se calcula la concentración efectiva de inhibidor. Para este fin, se calculan las relaciones de las velocidades de hidrólisis observadas con muestras 1 - 8 con respecto a la velocidad de hidrólisis observada con la muestra 9. La concentración efectiva de inhibidor se determina como la concentración más baja de la sustancia de ensayo, a la cual la relación de las velocidades de hidrólisis del sustrato no exceda del 50%. El resultado esperado: 30  $\mu$ M.

25 **Ejemplo 5.** Inmunización reactiva de ratones con el derivado de fosfonato de un fragmento de péptido de gp120.

Para inmunización, se conjuga el péptido reactivo es conjugado con el portador macromolecular hemocianina de *C. conholepas* (hemocianina de lapa californiana, KLH). En la primera etapa, se activa el portador con un exceso de bis (sulfosuccinimidilil)suberato en PBS durante 1 h a 37 °C. Después de la activación, la KLH no enlazada con bis (sulfosuccinimidilil)suberato se remueve de la reacción por medio de ultrafiltración exhaustiva siete veces (con un volumen residual de no más de 70  $\mu$ l) utilizando un concentrador Microcon 100 (membrana YC de Amicon), añadiendo cada vez PBS al residuo para hacer 500  $\mu$ l y descartando el ultrafiltrado. A la solución resultante se le añade una solución de peptidilsulfonato en PBS después de lo cual se incubaba la solución durante 1 h a 37 °C sin agitación. Los grupos succinimida que no reaccionaron se inactivan mediante la adición de 2  $\mu$ l de 2-etanolamina. Se remueven los componentes de bajo peso molecular de la reacción por medio de ultrafiltración exhaustiva siete veces (con un volumen residual de no más de 70  $\mu$ l) utilizando un concentrador Microcon 100 (membrana YC de Amicon), añadiendo cada vez PBS al residuo para hacer 500  $\mu$ l y descartando el ultrafiltrado. Se esteriliza la preparación final por filtración y se almacena a -20°C.

40 Se inmunizan en forma intraperitoneal ratones hembra **MRL-lpr/lpr**, **SJL** y **NZB / NZW F<sub>1</sub>** de 6 - 8 semanas con el antígeno en adyuvante completo de Freund, siendo el volumen total de 0,2 ml, con una dosis de 50  $\mu$ g de la proteína inmunogénica por ratón.

La segunda inmunización se realiza con el mismo volumen y a la misma concentración de antígeno en adyuvante incompleto de Freund 17 días después de la primera inmunización. Al mismo tiempo, se extrae sangre del seno orbital de tres ratones de cada grupo experimental y de ratones de control no inmunizados de las tres cepas para controlar el desarrollo de la respuesta inmune.

45 Veintiún días después del comienzo del experimento, se sacrifican los ratones que mostraron la máxima respuesta específica de antígeno en los ensayos inmunológicos para la esplenectomía. Se analizan los anticuerpos policlonales aislados del suero sanguíneo de estos ratones para la especificidad antigénica y la actividad catalítica.

Una parte del peptidilfosfonato sintetizado en las etapas previas se utiliza en la reacción de conjugación con el éster de N-hidroxisuccinimida de biotina. La reacción se lleva a cabo mezclando cantidades equimolares de sulfonato de peptidilo y biotina activada en un volumen mínimo de dimetilformamida e incubación durante 1 h. Las preparaciones biotiniladas están destinadas para el análisis de la especificidad de los anticuerpos obtenidos como resultado de la inmunización reactiva de los ratones.

Para controlar la respuesta inmune específica con el antígeno en diferentes ratones inmunizados de todas las tres cepas, se utiliza inmunoensayo enzimático.

Se aislaron los anticuerpos de los sueros de ratones inmunizados y de control con anticuerpos de cabra absorbidos previamente en placa contra IgG de múrido, con posterior incubación con el antígeno biotinilado y detección de los complejos antígeno-anticuerpo usando neutravidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. Los sueros de ratones inmunizados y de control se utilizan en varias diluciones (1:12 y 1:48). Los antígenos empleados son marcados con biotina partiendo de peptidilfosfonato, **Val**-fosfonato biotinilado, y nitrofenilmetil-p-biotinilfenilmetilfosfonato, para lo cual se demostró primero la modificación covalente específica del centro activo de abzimas. Los análisis comparativos han mostrado (FIG. 12) que los anticuerpos de los ratones experimentales de todas las tres cepas, en conjunto, poseen una alta especificidad hacia el fragmento del péptido modificado de un antígeno, no interactúan bajo las condiciones del presente experimento con **Val**-fosfonato libre, y exhiben la capacidad de lazarse covalentemente con un agente modificador más activo y menos específico. Cabe señalar que, en promedio, en híbridos de Nueva Zelanda la cantidad de anticuerpos específicos del antígeno fue algo mayor en comparación con las otras dos cepas autoinmunes, mientras que los anticuerpos de ratones **MRL-lpr/lpr** fueron más efectivos con respecto a covalente modificación.

Junto con un antígeno, se utilizan anticuerpos de conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante contra el fragmento Fc de IgG de múrido para determinar la cantidad total de anticuerpos de múrido absorbidos específicamente en un pozo de una placa. Esto permite la estimación de la proporción de anticuerpos específicos del antígeno en el conjunto total de inmunoglobulinas de clase G.

Se llevaron a cabo otros estudios del tipo de interacción de los anticuerpos obtenidos con un péptido reactivo con preparaciones previamente purificadas de IgG utilizando inmunotransferencias. Después de la incubación con peptidilfosfonato biotinilado, fraccionamiento electroforético bajo condiciones reductoras y desnaturalizantes, e inmovilización en membrana, se detectaron los complejos antígeno-anticuerpo utilizando neutravidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. Los resultados de este experimento presentado en la FIG. 13 sugieren que tanto las cadenas pesada como liviana de la inmunoglobulina capaces de ser covalentemente modificadas por el péptido estaban presentes en las preparaciones de anticuerpos policlonales aislados de ratones autoinmunes inmunizados con el péptido reactivo **Val-Ala-Glu-Glu-Glu-Val-PO (OPh)<sub>2</sub>**.

Por lo tanto, la inmunización reactiva bajo las condiciones del presente ejemplo ha producido los siguientes resultados:

- Los anticuerpos obtenidos en el transcurso de la inmunización se enlazan con antígeno de inmunización.
- Los anticuerpos no reaccionan con el grupo fosfonato "mínimo" de antígeno de inmunización, lo que significa que no existe una interacción específica (o reacción química no específica) entre los anticuerpos bajo de estudio y el grupo fosfonato libre de Val<sup>P</sup> (OPh)<sub>2</sub>.
- Los anticuerpos reaccionan con el fosfonato activo "que depende del mecanismo", es decir, muestran la capacidad de reaccionar con una molécula que no tiene una relación estructural aparente con el antígeno de inmunización, pero tiene la capacidad para formar complejos covalentes con hidrolasas.
- Los anticuerpos forman complejos covalentes con antígeno de inmunización.

En combinación, las propiedades anteriores sugieren que en el transcurso de la inmunización con un peptidilfosfonato cuya composición corresponde con LAEEEEV<sup>P</sup> (OPh)<sub>2</sub> se generan anticuerpos catalíticos específicos del epitopo.

Aplicabilidad industrial

La invención puede ser útil en la industria de medicamentos para la fabricación de fármacos.

#### LISTA DE SECUENCIAS

<110> "ASGL - Farmatsevticheskie Innovatsii", zakrytoe aktsionernoie obschestvo

## ES 2 440 369 T3

<120> Método para la producción de anticuerpos catalíticos (variantes), antígenos para inmunización y secuencia de nucleótidos

<140> 2001110759/13 (011749)

<141> 24. 04. 2001

5 <160> 2

<210> 1

<211> 365

<212> PTR

<213> Secuencia Artificial

10 <400> 1

Met	Ala	Thr	Glu	Lys	Leu	Trp	Val	Thr	Val
1				5					10
Tyr	Tyr	Gly	Val	Pro	Val	Trp	Lys	Glu	Ala
11				15					20
Thr	Thr	Thr	Leu	Phe	Cys	Ala	Ser	Asp	Ala
21				25					30
Lys	Ala	Tyr	Asp	Thr	Glu	Val	His	Asn	Val
31				35					40
Trp	Ala	Thr	His	Ala	Cys	Val	Pro	Thr	Asp
41				45					50
Pro	Asn	Pro	Gln	Glu	Val	Val	Leu	Ser	Cys
51				55					60
Asn	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Gln	Ala	Cys	Pro
61				65					70
Lys	Val	Ser	Phe	Glu	Pro	Ile	Pro	Ile	His
71				75					80
Tyr	Cys	Ala	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Ile	Leu
81				85					90
Lys	Cys	Asn	Asn	Lys	Thr	Phe	Asn	Gly	Thr
91				95					100
Gly	Pro	Cys	Thr	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Gln
101				105					110
Cys	Thr	His	Gly	Ile	Arg	Pro	Val	Val	Ser
111				115					120
Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Ser	Leu	Ala
121				125					130
Glu	Glu	Glu	Val	Val	Ile	Arg	Ser	Val	Asn
131				135					140
Phe	Thr	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Ile	Ile	Val
141				145					150
Gln	Leu	Asn	Thr	Ser	Val	Glu	Ile	Asn	Cys
151				155					160
Thr	His	Cys	Asn	Ile	Ser	Arg	Ala	Lys	Trp
161				165					170
Asn	Asn	Thr	Leu	Lys	Gln	Ile	Ala	Ser	Lys
171				175					180
Leu	Arg	Glu	Gln	Phe	Gly	Asn	Asn	Lys	Thr
181				185					190
Ile	Ile	Phe	Lys	Gln	Ser	Ser	Gly	Gly	Asp

191				195					200
Pro	Glu	Ile	Val	Thr	His	Ser	Phe	Asn	Cys
201				205					210
Gly	Gly	Glu	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asn	Ser	Thr
211				215					220
Gln	Leu	Phe	Asn	Ser	Thr	Trp	Phe	Asn	Ser
221				225					230
Thr	Trp	Ser	Thr	Glu	Gly	Ser	Asn	Asn	Thr
231				235					240
Glu	Gly	Ser	Asp	Thr	Ile	Thr	Leu	Pro	Cys
241				245					250
Arg	Ile	Lys	Gln	Ile	Ile	Asn	Met	Trp	Gln
251				255					260
Lys	Val	Gly	Lys	Ala	Met	Tyr	Ala	Pro	Pro
261				265					270
Ile	Ser	Gly	Gln	Ile	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn
271				275					280
Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Arg	Asp	Gly
281				285					290
Gly	Asn	Ser	Asn	Asn	Glu	Ser	Glu	Ile	Phe
291				295					300
Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Met	Arg	Asp	Asn
301				305					310
Trp	Arg	Ser	Glu	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Val
311				315					320
Val	Lys	Ile	Glu	Pro	Leu	Gly	Val	Ala	Pro
321				325					330
Thr	Lys	Ala	Lys	Leu	Asp	Pro	Asn	Ser	Ser
331				335					340
Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Val
341				345					350
His	Phe	Phe	Lys	Asn	Ile	Val	Thr	Pro	Arg
351				355					360
Thr	Pro	Pro	Pro	Ser					
361				365					

<210> 2

<211> 1149

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<400> 2

ATGGCTACAG	AAAAATTGTG	GGTCACAGTC	TATTATGGGG	TACCTGTGTG	GAAGGAAGCA	60
ACCACCACTC	TATTTTGTGC	ATCAGATGCT	AAAGCATATG	ATACAGAGGT	ACATAATGTT	120
TGGGCCACAC	ATGCCTGTGT	ACCCACAGAC	CCCAACGAAG	TAGTATTGAG	CTGCAACACC	180
TCTGTCAATTA	CACAGGCCTG	TCCAAAGGTA	TCCTTTGAGC	CAATTCCCAT	ACATTATTGT	240
GCCCCGGCTG	GTTTTGCGAT	TCTAAAATGT	AATAATAAGA	CGTTCAATGG	AACAGGACCA	300
TGTACAAATG	TCAGCACAGT	ACAATGTACA	CATGGAATTA	GGCCAGTAGT	ATCAACTCAA	360
CTGCTGTAA	ATGGCAGTCT	AGCAGAAGAA	GAGGTAGTAA	TTAGATCTGT	CAATTTACAG	420
GACAATGCTA	AAACCATAAT	AGTACAGCTG	AACACATCTG	TAGAAATTA	TTGTACACAT	480
TGTAACATTA	GTAGAGCAA	ATGGAATAAC	ACTTTAAAAC	AGATAGCTAG	CAAATTAAGA	540
GAACAATTTG	GAAATAATAA	AACAATAATC	TTTAAGCAAT	CCTCAGGAGG	GGACCCAGAA	600
ATTGTAACGC	ACAGTTTTAA	TTGTGGAGGG	GAATTTTTCT	ACTGTAATTC	AACACAACCTG	660
TTTAATAGTA	CTTGGTTTTAA	TAGTACTTGG	AGTACTGAAG	GGTCAAATAA	CACTGAAGGA	720
AGTGACACAA	TCACCCTCCC	ATGCAGAATA	AAACAAATTA	TAAACATGTG	GCAGAAAGTA	780
GGAAAAGCAA	TGTATGCCCC	TCCCATCAGT	GGACAAATTA	GATGTTTCATC	AAATATTACA	840
GGGCTGCTAT	TAACAAGAGA	TGGTGGTAAT	AGCAACAATG	AGTCCGAGAT	CTTCAGACCT	900
GGAGGAGGAG	ATATGAGGGA	CAATTGGAGA	AGTGAATTAT	ATAAATATAA	AGTAGTAAAA	960
ATTGAACCAT	TAGGAGTAGC	ACCCACCAAG	GCAAAGCTGG	ATCCCCACCA	CCACCACCAC	1020
CACGGTTCCG	GCCAACAAAA	ACTCATCTCA	GAAGAGGATC	TGAATTCGAG	CTCCGTCGAC	1080
AAGCTTGCGG	CCGCAGTAGT	CCATTTCTTC	AAGAACATTG	TGACACCTCG	AACACCACCT	1140
CCATCCTAA						1149

## REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión que tiene la siguiente estructura:

```

MATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLEFCASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTD 50
PNPQEVVLSCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFNGT 100
GPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEDEVVIRSVNFTDNAKTIIV 150
QLNTSVEINCTHCNISRAKWNNTLKQIASKLREQFGNNKTIIFKQSSGGD 200
PEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNTEGSDTITLPC 250
RIKQIINMWQKVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNSNNESEIF 300
RPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTKAK 334

```

NcoI KpnI

ACC ATG GCT

ACAGAAATATCTGCGGTCAGatctatattggggacctctctggaa gcaagcaaceacc 60

actctatcttctgcafcagatctctaaagcaataaataatcaatagctacataa tctttggccc 120

acacatgcccctctataccccagacccccac

CCACAAGCAAGTAGTATTGAG CTGCAACACC 180

TCTGTcatta cacagcctg tccaaaggtat cctttgagc caattcccat acattattgt 240

gcccggctg gttttgcgat tctaaaatgt aataataaga cgttcaatgg aacaggacca 300

tgtacaatg tcagcacagt acaatgtaca catggaatta ggccagtagt atcaactcaa 360

BglII

ctgctgttaa atggcagtct agcagaagaa gaggtagtaa ttgactctgt caatttcacg 420

gacaatgcta aaaccataat agtacagctg aacacatctg

TAGAAATTAA TTGTACA ~~CAAT~~ 480

DraI

TGTAACATTAGTAgagcaaaaaggaaataaacctaaacagatagctagcaaataga 540

gaacaatttggaaaataaataaacaataatcttttagcaatcctcaagggggacccagaa 600

attetaagc acagttttaaattctggagggaattttct actetaattc aacacaactg 660

tttaatagta-cttggtttaa-tactacttggactctgaag-ggtcaataa cactgaagga 720

agtcacaaa tcaccctccc atgcagaata aaacaaatta taaacatgtg gcagaaagta 780

ggaaaagcaa tctatgcccc tcccatcagt ggacaaatta gatgttcac aaatattaca 840

BglII

ggctctctat taacaagaga tcttctaat agcaacaatg agtccgagat cttcagacct 900

ggaggaggag atatgaggga caattggaga agtgaattat ataatataa agtagtaaaa 960

attgaacct taggagtaGC ACCACCAAG GCAAAG CTG GAT CCT

BamHI

FIG.1

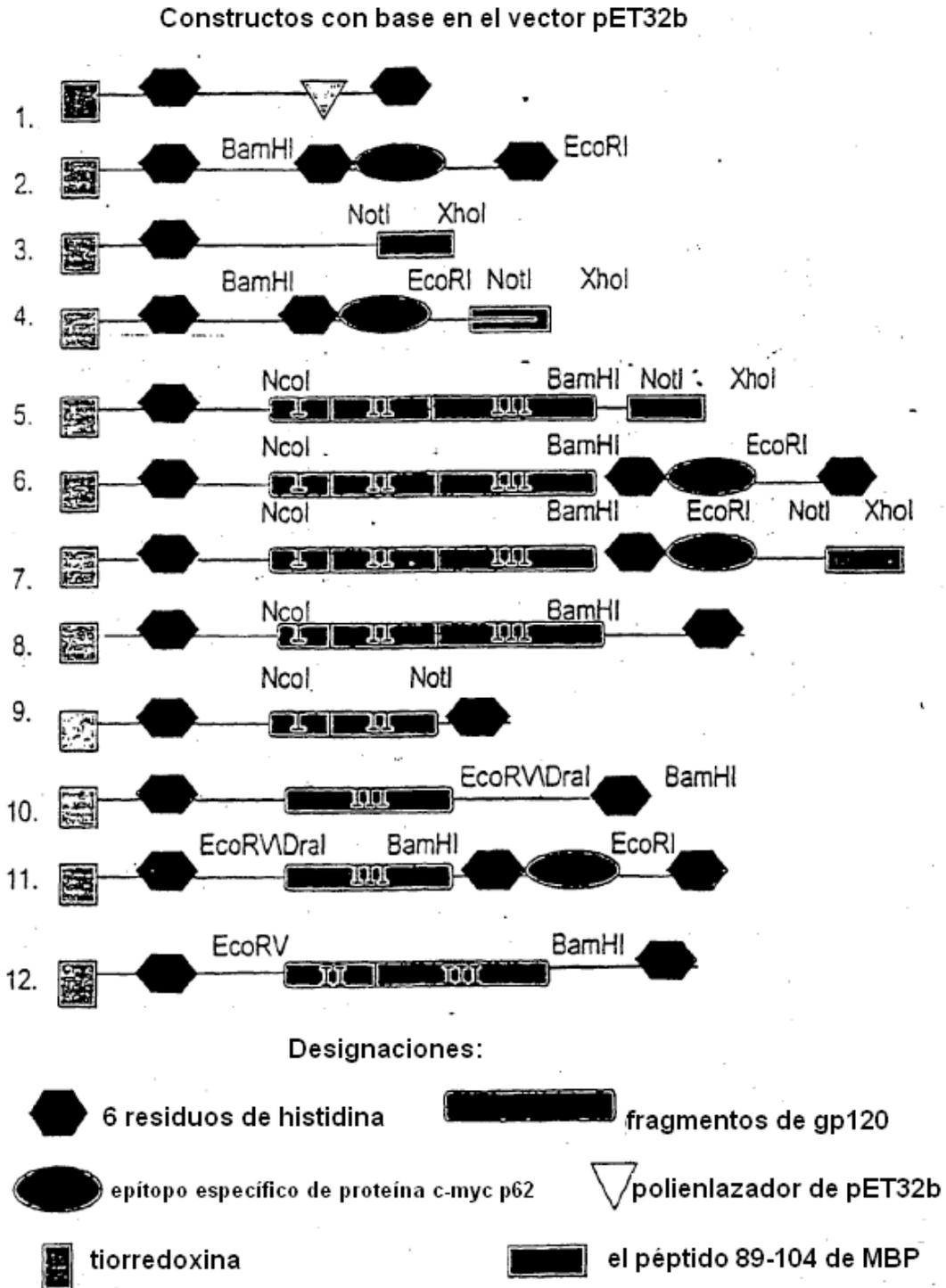
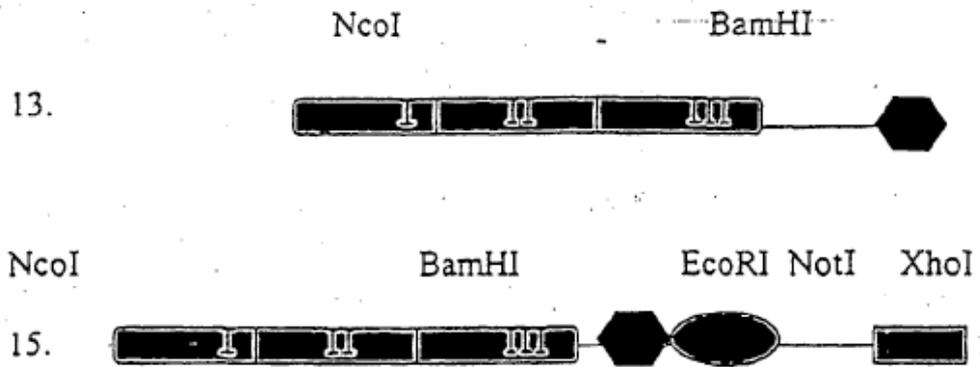


FIG.2

Constructos con base en el vector pET28a



Designaciones:



6 residuos de histidina



fragmentos de gp120



epitopo específico de proteína p62



el péptido 89-104 de MBP

FIG.3

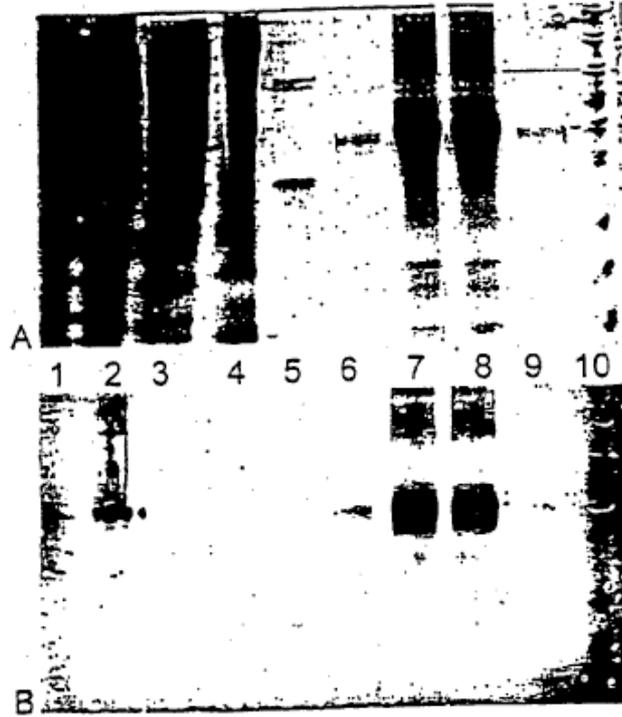
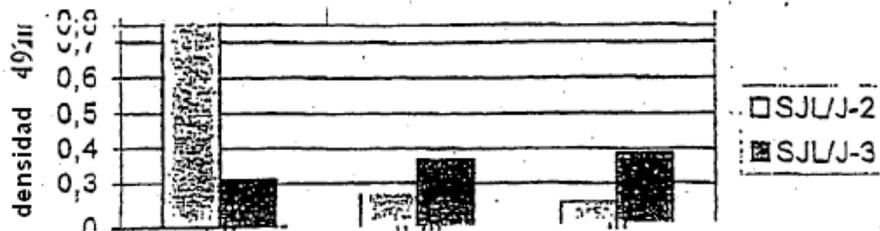


FIG.4

Análisis de la especificidad antigénica de anticuerpos en suero de ratones SJL inmunizados con la proteína de fusión gp120I-IIImbp a diferentes dosis



dosis de inmunógeno:

**SJL-2** son ratones inmunizados con una dosis de 150  $\mu\text{g}$  por ratón

**SJL-3** son ratones inmunizados con una dosis de 300  $\mu\text{g}$  por ratón

FIG.5

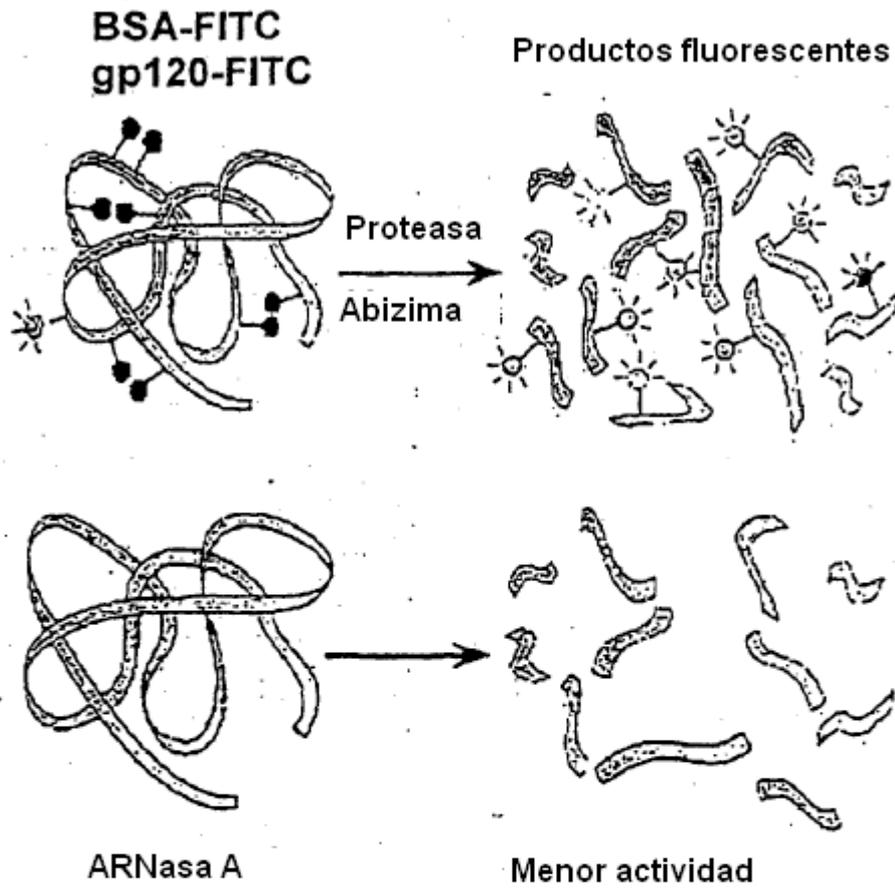


FIG.6

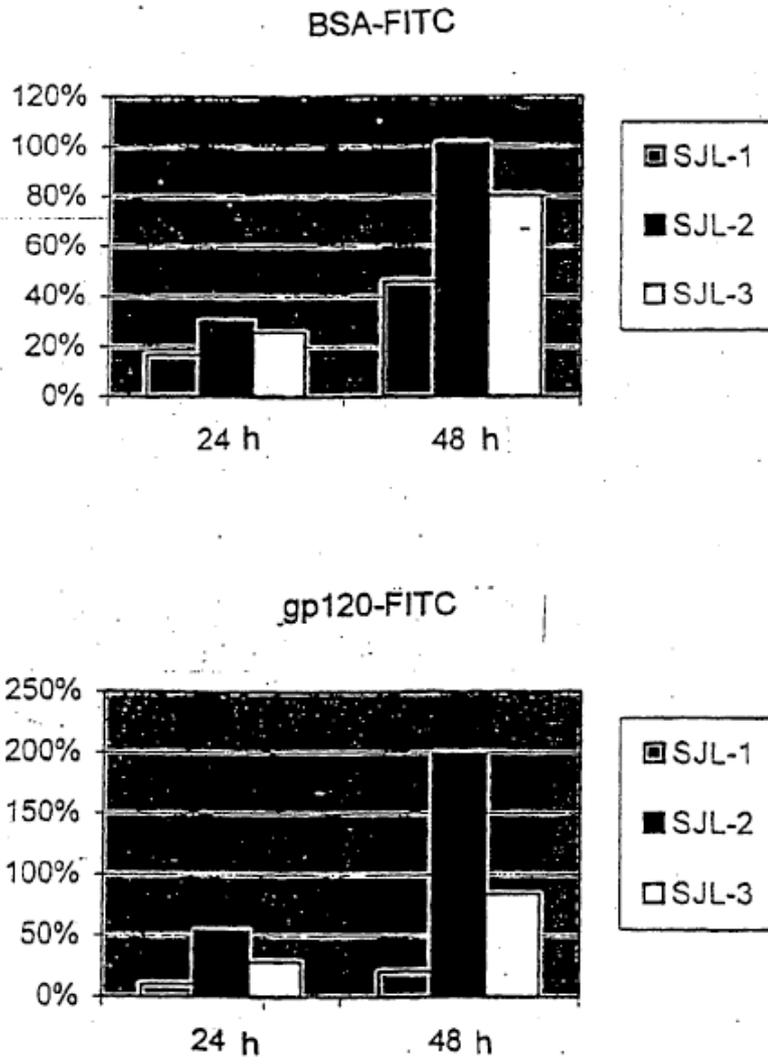


FIG.7

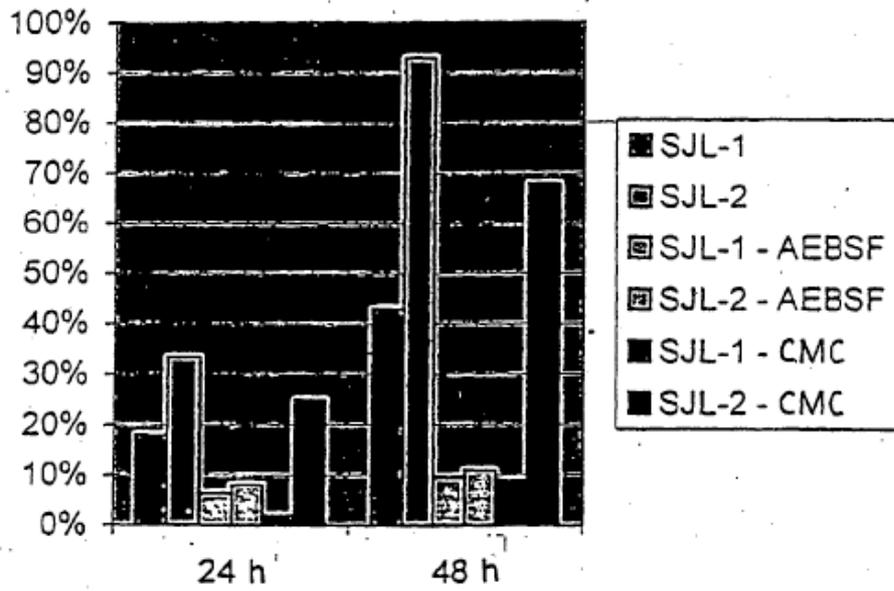


FIG.8

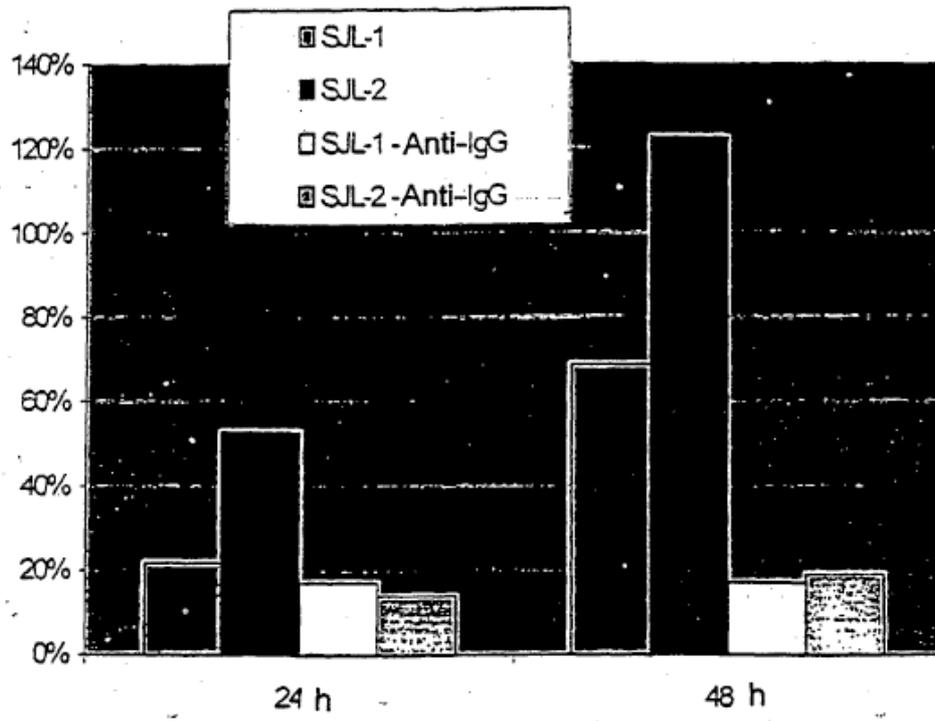


FIG.9



FIG.10

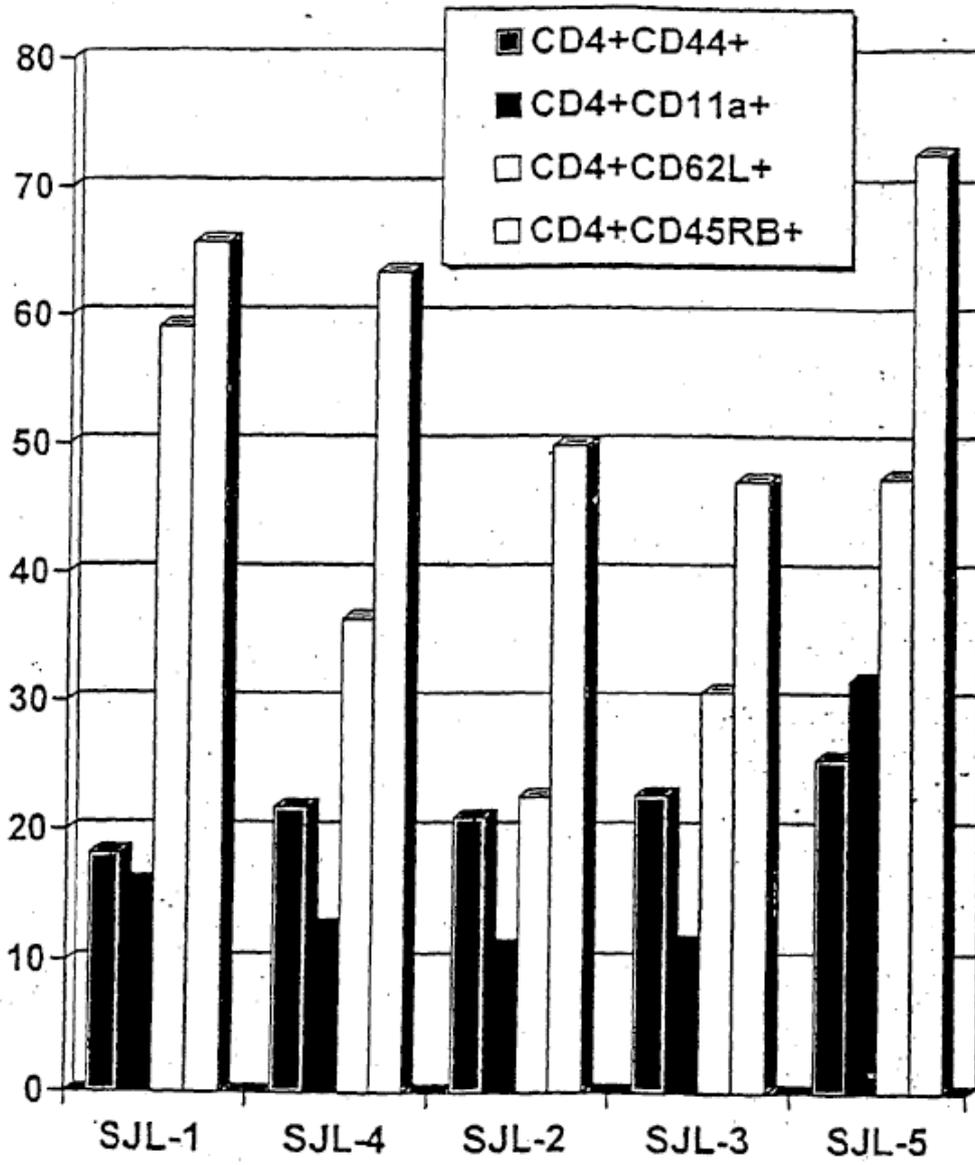


FIG.11

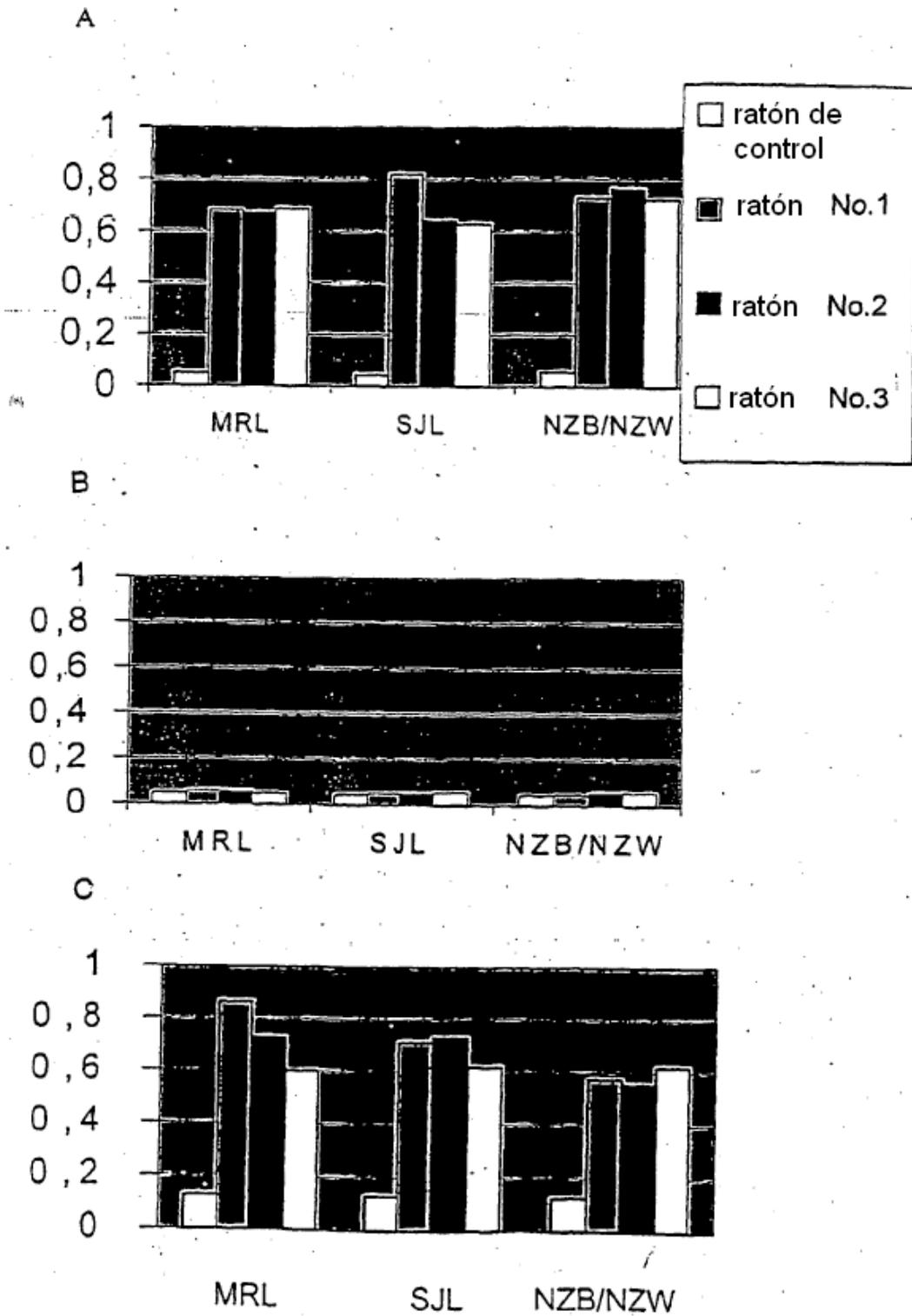


FIG.12

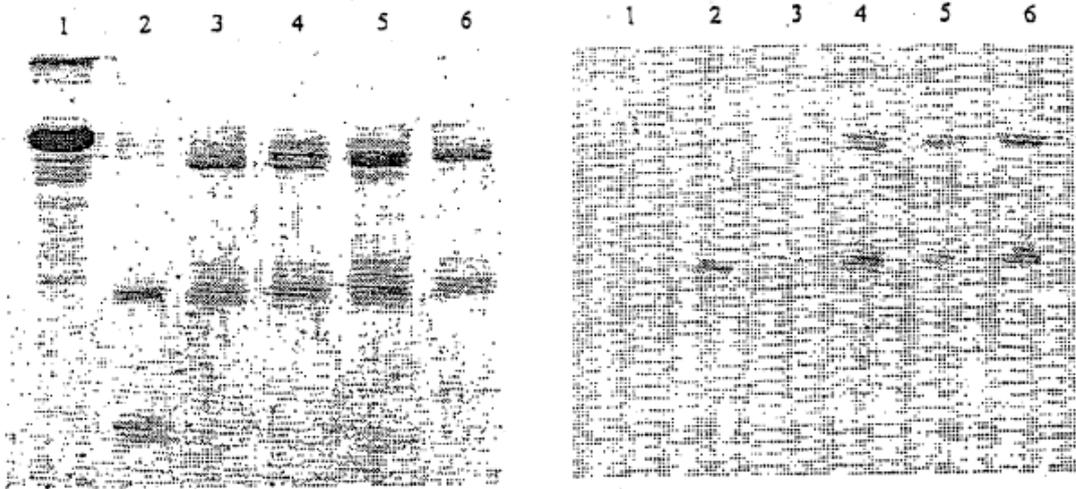


FIG.13