

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 997**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008 E 08828940 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2197912**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-Chikungunya y usos de los mismos**

30 Prioridad:

07.09.2007 CA 2598966

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

13.11.2015

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (100.0%)
28 RUE DU DOCTEUR ROUX
75015 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**BREHIN, ANNE-CLAIRE;
SALL, AMADOU ALPHA y
DESPRES, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 550 997 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

Anticuerpos monoclonales anti-Chikungunya y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la arbovirosis causada por el virus Chikungunya (CHIK). La presente invención concierne específicamente a anticuerpos monoclonales (MAbs) anti-CHIK, y más específicamente MAbs anti-CHIK.E2 y su uso como productos de diagnóstico en métodos para detección de la presencia o ausencia de una cepa de CHIK.

10 **Antecedentes de la invención**

El virus Chikungunya (CHIK) tiene la capacidad de causar epidemias explosivas en África, India, y el Sudeste de Asia (Epstein, 2007; revisado por Powers y Logue, 2007). El virus es transmitido por mosquitos del género *Aedes* (*Ae.*). El virus CHIK ha sido responsable de epidemias de magnitud sin precedentes en la isla La Reunión y el Océano Indico desde 2005, y en India, en donde una cifra estimada de 1,4 millones de habitantes se han infectado en 2006 (Schuffenecker *et al.*, 2006; Staikowsky *et al.*, 2006; Arankalle *et al.*, 2007; revisado por Pialoux *et al.*, 2007).

Los humanos infectados con el virus CHIK experimentan típicamente enfermedad aguda con poliartralgia incapacitante, dolor muscular severo y rigidez en las articulaciones seguida a veces por una erupción maculopapular (Johnston y Peters, 1996; Borgherin *et al.*, 2007; revisado por Pialoux *et al.*, 2007; Rulli *et al.*, 2007). La infección del virus CHIK está asociada en casi todos los casos con mialgias. La infección del virus CHIK de las células satélites en el interior de los músculos podría explicar, en parte, algunas características de las manifestaciones clínicas (Ozden *et al.*, 2007). Los síntomas clínicos de la infección de virus Chikungunya son a menudo diagnosticados erróneamente para enfermedades arbovirales debido a otros alphavirus artrítogénicos tales como el virus Igbo-Ora de África Occidental, el virus O'nyong-nyong (ONN) de África Central, los virus Ross River y Barma de Australia y el virus Pacífico Mayaro de América del Sur, así como el virus Sindbis (SIN) cosmopolita.

El virus CHIK es un miembro del género *alphavirus* y la familia *Togaviridae* (revisado por Strauss y Strauss, 1994). Los alphavirus son pequeños virus de RNA positivos monocatenarios envueltos que exhiben un gran tropismo celular. Las superficies virales están cubiertas de picos anclados a la membrana compuestos de tripletes de heterodímeros de las glicoproteínas E1 y E2 de la envoltura. Las proteínas del pico viral facilitan la fijación a las superficies celulares y la entrada del virus. La glicoproteína E1 de la envoltura es una proteína de fusión de clase II que media la fusión membranal activada a pH bajo durante la infección del virus. E2 es una glicoproteína transmembranal de tipo I de 50 kDa: los primeros 260 aminoácidos constituyen el ectodominio, seguido por aproximadamente 100 aminoácidos que forman la región del vástago, una región que abarca 30 aminoácidos, y un endodominio citoplásmico corto de 30 aminoácidos (Pletnev *et al.*, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2006). pE2 (el precursor de 62 kDa para las proteínas E3 y E2) y E1 están ensamblados como heterodímeros en el retículo endoplásmico (revisado por Strauss y Strauss, 1994). Después de la escisión de pE2 en el aparato de Golgi para formar E3 y E2, los complejos E1-E2 son transportados a la membrana plasmática (PM). La interacción del ectodominio citoplásmico E2 con la nucleocápsida preensamblada es uno de los pasos iniciales en el proceso de la envoltura del virus en la PM. La integridad del virion se mantiene por interacciones directas entre E1 y E2 (Strauss y Strauss, 1994). Durante el curso del ciclo vital del alphavirus, la glicoproteína E2 es responsable de la fijación del receptor. La mayoría de los anticuerpos neutralizantes reconocen epítopos en E2 más bien que en E1 (revisado por Strauss y Strauss, 1994). Los anticuerpos que reconocen epítopos conformacionales en la superficie exterior de E2 tienen potencial para neutralizar la infección de alphavirus.

La diagnosis biológica de la infección de virus CHIK está basada esencialmente en un método cuantitativo en tiempo real basado en RT-PCR durante la fase virémica inicial (Edwards *et al.*, 2007; Laurent *et al.*, 2007; Santhosh *et al.*, 2007). Los métodos serológicos detectan tempranamente IgM anti-CHIK después de las primeras manifestaciones clínicas e IgG específica después de 2 semanas (revisado por Pialoux *et al.*, 2007). Sin embargo, los ensayos ELISA y de inmunodetección son escasamente específicos y sensibles debido a la reactividad cruzada del virus CHIK con miembros afines del complejo antigénico del Bosque de Semliki (SF) (Greiser-Wilke *et al.*, 1991).

50 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1: Composición de la proteína CHIK y especificidad antigénica de la preparación viral. Antígenos CHIK (CHIK Ags) se separaron por 4-12% SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes y se visualizaron directamente por tinción con Azul Coomassie (izquierda) o se sometieron a electrotransferencia sobre una membrana de PVDF para análisis de inmunotransferencia utilizando anti-CHIK HMAF (derecha). Las posiciones de los marcadores de peso molecular (MW) se indican en kDa.

Figura 2: Antigenicidad de la glicoproteína CHIK sE2 recombinante soluble. Se realizó el análisis de inmunotransferencia con la proteína CHIK.sE2 recombinante soluble purificada y DEN-1 sE anti-CHIK HMAF (CHIK HMAF), suero humano normal (suero neg.), y suero de paciente CHIK-positivo (suero CHIK pos.).

5 **Figura 3:** Ensayos de clasificación cinética en sobrenadantes de hibridoma productores de anticuerpos. Las curvas muestran la fijación monitorizada en unidades de resonancia (RU) de la proteína 50 mM CHIK.sE2 en sobrenadantes de hibridoma productores de anticuerpos 3C3, 3E4, 5A8, 6F2, 8A4, y 9B5 a lo largo del tiempo.

10 **Figura 4:** Sensibilidad de detección de E2 utilizando MABs anti-CHIK.E2. Se utilizó el virus CHIK purificado con sacarosa para recubrir las placas ELISA a 10^5 FFU/pocillo y se añadieron concentraciones crecientes de MABs 3C3 (\blacktriangle), 3E4 (\circ), y 8A4 (\blacksquare). La reactividad de MABs se ensayó por ELISA indirecto como se describe en Métodos.

15 **Figura 5:** Reactividad de MABs anti-CHIK.E2 con E2 sintetizado endógenamente en células infectadas. Se infectaron células Vero 24 horas con virus CHIK.06-49 a 0,4 MOI. En (A), detección de E2 por ensayo IF utilizando MABs anti-CHIK.E2. Las células fijadas se permeabilizaron (+TX-100) o no se permeabilizaron (-TX-100) y se sometieron luego a inmunotinción con $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MAB 3C3, 3E4, o 8A4. Se utilizó como control anti-CHIK HMAF (dilución 1:500). En (B), análisis de citometría de flujo de células infectadas con el virus CHIK utilizando MABs anti-CHIK.E2. Las células infectadas fijadas (línea continua) o células falsamente infectadas (línea de puntos) se permeabilizaron con saponina (línea negra) o no se permeabilizaron (línea gris) y se sometieron luego a inmunotinción con $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de MAB 3C3, 3E4, o 8A4. Como control positivo se utilizó anti-CHIK HMAF (dilución 1:500).

20

25 **Figura 6:** Se determinó la reactividad de MABs anti-CHIK.E2 para las proteínas E2 reducidas por análisis de inmunotransferencia. Las membranas se transfirieron con 100 ng de proteína CHIK.sE2 purificada (pista 1) o 10^5 FFU de virus CHIK purificado con sacarosa (pista 2) y se incubaron individualmente con MAB 3C3, 3E4, u 8A4 como se describe en Métodos. Como control positivo se utilizó anti-CHIK HMAF.

30 **Figura 7:** Alineación de secuencias E2 de CHIK (SEQ ID NO: 1), Igbo-Ora (SEQ ID NO: 2) y virus ONN (SEQ ID NO: 3), mostrando la región de los residuos E2-1 a E2-364. Los sitios de glicosilación enlazados a asparagina están marcados con (\blacklozenge). Los marcos abiertos indican las tres diferencias específicas de los aminoácidos en el virus ONN en comparación con los virus CHIK e Igbo-Ora.

35 **Figura 8:** Sensibilidad de ELISA de captura de antígeno utilizando MABs anti-CHIK E2. Se realizó un análisis cuantitativo utilizando MAB 8A4 como anticuerpo de captura y MAB 3E4 como anticuerpo de detección y sobrenadantes de cultivo de virus (A) y glicoproteína recombinante soluble CHIK.sE2 como antígeno viral (B). En (A), virus CHIK.06-49 diluido en serie desarrollado en células de mosquito AP61 (\bullet) o células humanas 293A (\square). En (B) concentraciones crecientes de proteína recombinante soluble CHIK.sE2 purificada.

40 Breve descripción de la invención

Los inventores han desarrollado y caracterizado anticuerpos monodonaes (MABs) que encuentran una ventaja particular en el estudio de la biología del virus CHIK y la patogénesis de la enfermedad relacionada con CHIK.

45 Como puede apreciar un experto en la técnica, la originalidad de la presente invención reside en el hecho de que los inventores han producido y caracterizado un panel de anticuerpos monodonaes (MABs) que se fijan específicamente al virus CHIK entero o a la glicoproteína CHIK E2, incluso a su forma soluble.

50 En conexión con esto, la presente invención proporciona un anticuerpo monodonal que se fija específicamente a un epítipo localizado en la superficie externa de un virus CHIK, tal como los depositados en la NCCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, en fecha 6 de septiembre 2007 bajo los números de acceso I-3824 (3E4), e I-3823 (8A4). Como se utiliza en esta memoria, el término "se fija específicamente a" se refiere a anticuerpos que se fijan con afinidad relativamente alta a una proteína CHIK contemplada por la presente invención, tal como la glicoproteína E2, pero que no reconocen sustancialmente ni se fijan a moléculas distintas de la glicoproteína CHIK E2. Como se utiliza en esta memoria, el término "afinidad relativamente alta" significa una afinidad de fijación entre el anticuerpo y la proteína de interés de al menos 10^{-6} M, y con preferencia de al menos aproximadamente 10^{-7} M y de modo aún más preferible 10^{-8} M a 10^{-10} M. La determinación de dicha afinidad se realiza preferiblemente en condiciones de inmunoensayo estándar de fijación competitiva que es conocimiento común para un experto en la técnica.

60 Como se utiliza en esta memoria, el término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína producida por células linfoides en respuesta a una estimulación con un inmunógeno. Los anticuerpos poseen la capacidad de reaccionar *in vitro* e *in vivo* específica y selectivamente con un determinante antigénico o epítipo que provoca su producción o con un determinante antigénico estrechamente relacionado con el antígeno homólogo. El término "anticuerpo" debe entenderse que abarca construcciones que utilizan la región de fijación (variable) de dicho anticuerpo, y otras modificaciones del anticuerpo. Así, un anticuerpo puede comprender un anticuerpo entero, un fragmento de

65

anticuerpo, un agregado polifuncional de anticuerpo, o en general una sustancia que comprende uno o más sitios de fijación específicos de un anticuerpo. El fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento tal como un fragmento Fv, Fab o F(ab')₂ o un derivado del mismo, tal como un fragmento Fv monocatenario. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser no recombinante, recombinante o humanizado. El anticuerpo puede ser de un tipo de inmunoglobulina, v.g., IgG, IgM, etcétera. Adicionalmente, puede utilizarse en caso apropiado un agregado, polímero, derivado y conjugado de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención o combinación de los mismos, encuentran un uso particular como reactivos de diagnóstico, y/o para el cribado de una infección de CHIK incluso si tal infección es asintomática. Los anticuerpos monodonaes de la invención encuentran un uso adicional en métodos de diagnóstico que pueden incluir, pero sin carácter limitante, ensayos de inmunofluorescencia, inmunotransferencia y ELISA.

Se proporciona un método para detección de la presencia o ausencia de una cepa de *Chikungunya virus* (CHIK) en una muestra, que comprende los pasos de:

- a) puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo monoclonal anti-CHIK de la presente invención o con una combinación de anticuerpos monoclonales anti-CHIK de la invención para formar un complejo inmune; y
- b) detección de la presencia o ausencia del complejo inmune formado en a).

Más específicamente, la presente invención concierne a un método para detección de la presencia o ausencia del polipéptido E2 de la envoltura o derivado funcional o su precursor E3E2 (p62) del polipéptido E2 de *Chikungunya* (CHIK) en una muestra, que comprende los pasos de:

- a) puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo monoclonal E2 anti-CHIK de la presente invención o con una combinación de anticuerpos monoclonales anti-CHIK de la invención para formar un complejo inmune; y
- b) detección de la presencia o ausencia del complejo inmune formado en a).

Como se utiliza en esta memoria, el término "derivado funcional" se refiere a un fragmento de la glicoproteína E2, tal como el ectodominio E2, que retiene todavía la capacidad de ser reconocido por los anticuerpos monoclonales de la presente invención. El término "epítipo" se refiere al sitio en un antígeno, tal como la glicoproteína E2, al cual se fija una molécula de anticuerpo específica, tal como los anticuerpos monodonaes de la invención. Como se utiliza en esta memoria, el término "muestra" se refiere a una diversidad de tipos de muestra obtenidos a partir de un individuo y puede utilizarse en un ensayo de diagnóstico o detección conforme a la presente invención. La definición abarca sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras sólidas de tejido tales como un espécimen de biopsia o cultivos o células de tejido derivados del mismo, y la progenie del mismo.

Como puede apreciarse, en el caso en que se utiliza una combinación de anticuerpos monodonaes anti-CHIK, un anticuerpo monoclonal puede consistir en un anticuerpo de captura, tal como 8A4, y un segundo anticuerpo monoclonal puede consistir en un anticuerpo de detección, tal como 3E4. Tales anticuerpos de captura y de detección pueden encontrar, por ejemplo, uso ventajoso en un ensayo ELISA.

La presente invención concierne también a un kit para detección de la presencia o ausencia de una cepa de *Chikungunya virus* (CHIK) en una muestra, y más específicamente para detección de la presencia o ausencia de un polipéptido E2 de *Chikungunya virus* (CHIK) en una muestra. Los kits comprenden al menos un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo depositado en la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, en fecha 6 de septiembre 2007 bajo los números de acceso I-3824 (3E4), e I-3823 (8A4). Los kits pueden comprender paquetes, cada uno de los cuales contiene uno o más de los anticuerpos monodonaes arriba mencionados (típicamente en forma concentrada) que se requieren para realizar los tests de diagnóstico respectivos.

EJEMPLO

Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales de ratón reactivos con la glicoproteína e2 de la envoltura de *chikungunya*

La fiebre *Chikungunya* es una arbovirosis de gran impacto en la salud pública en Asia y África. El virus *Chikungunya virus* (CHIK) es miembro del género *Alphavirus* y pertenece al complejo antigénico del Bosque de Semliki (SF). Los inventores describen por primera vez un panel de anticuerpos monoclonales (MAbs) reactivos con la glicoproteína E2 de la envoltura de CHIK. Para el cribado de MAbs específicos de E2, los inventores expresaron una proteína recombinante soluble CHIK E2 en células S2 de *Drosophila*. Analizados por métodos inmunológicos, se seleccionaron MAbs 3C3, 3E4 y 8A4 sobre la base de su reactividad. Sus epítipos están localizados en la superficie exterior de los viriones de CHIK. Estos MAbs no tienen reactividad cruzada alguna con los miembros afines del complejo antigénico SF, con la notable excepción del virus Igbo-Ora. Los MAbs E2 anti-CHIK 3C3, 3E4, y 8A4 son útiles para estudiar la biología del virus CHIK y la patogénesis de la enfermedad. La combinación de 8A4 y 3E4 es adecuada para desarrollar un ELISA específico de captura de antígeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Linajes de células y virus CHIK

5 Se cultivaron células Vero en medio de crecimiento de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) suplementado con 5% de suero bovino fetal (FBS) desactivado por calor y 2 mM L-glutamina. Las células 293A (Quantum) se dejaron crecer en medio de crecimiento DMEM con piruvato (Invitrogen) suplementado con 10% FBS y 2 mM L-glutamina. Las células Vero y 293A se incubaron a 37°C bajo CO₂. Las células de mosquito AP61 *Aedes pseudoscutellaris* se cultivaron en medio de crecimiento Leibovitz L-15 suplementado con 10% SBS y 1% de caldo triptosa-fosfato (Eurobio). El linaje de células Schneider 2 (S2) de *Drosophila melanogaster* se adquirió de Invitrogen. Las células S2 se dejaron crecer en medio de crecimiento Schneyder (Invitrogen) con 10% de FBS. Las células AP61 y S2 de invertebrados se incubaron a 27°C. Todos los medios se suplementaron con los antibióticos penicilina y estreptomycinina.

15 El virus CHIK.06-49 (genotipo 4) se aisló de un adulto joven durante la epidemia de 2006 de fiebre Chikungunya en la isla La Reunión (Schuffenecker *et al.*, 2006). El virus se hizo pasar dos veces a través de linajes de células de mosquito. Los stocks de virus se titularon por inmunoensayo estandarizado de enfoque de células AP61 (FIA) utilizando anti-CHIK HMAF, y los títulos se expresaron como FFU.mL⁻¹ (Schuffenecker *et al.*, 2006). Se obtuvieron concentraciones altas de CHIK.06-49 purificado a partir de células de mosquito infectadas. Resumidamente, se inocularon 20 matraces de monocapas de células AP61 con virus CHIK a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,4 FFU por célula. Los fluidos sobrenadantes de las células infectadas se cosecharon dos días después de la infección y se clarificaron. El virus se precipitó con 10% (p:v) de polietilenglicol (PEG) 8000 (Fluka) en 0,5 M NaCl a 4°C durante 4 horas. Después de la centrifugación, el sedimento se resuspendió en tampón TNE (20 mM Tris-Cl [pH 8,0], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) y se centrifugó en un gradiente discontinuo de sacarosa compuesto de 60% (p:p) y 30% (p:v) de sacarosa a 39.000 rpm a 4°C durante 2 h. La banda visible en la interfase se recogió y se diluyó en tampón TNE. El virus se purificó ulteriormente en un gradiente continuo de sacarosa 11-52% (p:v) a 35.000 rpm a 4°C durante 18 h. La banda visible se recogió, se dividió en partes alícuotas, y se guardó a -80°C.

Producción de antígenos CHIK

30 Se generaron concentraciones altas de antígenos CHIK a partir de partículas de virus. Se inocularon 40 matraces de monocapas de células AP61 con virus CHIK.06-49 a 0,4 MOI. Los fluidos sobrenadantes de las células infectadas se recogieron dos días después de la infección y se clarificaron. Las partículas de virus se precipitaron con PEG 8000 en presencia de 0,5 M NaCl como se ha descrito arriba. El sedimento nuevamente suspendido en tampón TNE se suplementó con 20 mM trietanolamina (Sigma) y se incubó luego con 2% Triton X-100 (Sigma) durante 10 min en hielo. La suspensión se centrifugó durante 1 min a 2000 rpm y la preparación clarificada se aplicó a un gradiente continuo de sacarosa 10 a 30% y se centrifugó a 35.000 rpm durante 16 h a 4°C. Se recogieron fracciones de la parte superior y se evaluaron por tinción con Azul Coomassie en SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las fracciones reunidas que contenían antígenos CHIK (preparación viral) se desactivaron por UV y la infectividad residual se comprobó por FIA.

Producción de clones de hibridoma productores de anticuerpos

45 Se emulsionaron 3 µg de preparación viral en una ratio igual con adyuvante completo de Freund (Sigma). Cuatro ratones BALB/c de 11 semanas (Charles River) se inmunizaron por inyecciones subcutáneas. Se administraron dos inyecciones de refuerzo a las mismas dosis con intervalos de 3 semanas. Los ratones se sangraron 10 días después de cada refuerzo. Se administró un refuerzo pre-fusión 4 días antes de la fusión (la misma dosis dividida en 4 inyecciones, 2 inyecciones subcutáneas seguidas por 2 inyecciones intraperitoneales).

50 Se fusionó el linaje de células de mieloma Sp2/0Ag14 con esplenocitos de ratones inmunizados conforme a protocolos estándar. Los hibridomas productores de anticuerpos se subdonaron dos veces y se congelaron en nitrógeno líquido. Se produjeron anticuerpos monoclonales *in vitro* por recogida de los sobrenadantes de alta concentración. Las purificaciones se realizaron por cromatografía de afinidad sobre n-proteína A Sepharose (GE Healthcare). Se determinó el isotipo de los MAbs con un kit de test de isotipificación de mAb de ratón (AbD Serotec) conforme a las recomendaciones del fabricante.

Construcción y expresión de la proteína sE2 recombinante soluble de CHIK

60 La secuencia CHIK.06-49 (no. de acceso a GenBank AM258994) codificante del ectodominio seguida por la región vástago de E2 (residuos E2-4 a E2-364) se amplificó a partir de un plásmido TOPO que contenía el gen CHIK.06-49 pE2 utilizando PCR con el cebador directo 5'AAAAAGATCTGACAACCTTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACC-3' (SEQ ID NO: 4) y el cebador inverso 5'-TTTTTGC GCCCGCGTCATAGTGGGGTACAGCTCATAATAATACAG-3' (SEQ ID NO: 5). El producto PCR se digirió con *Bgl* II y *Not* I y se insertó luego en los sitios singulares *Bgl* II y *Not* I del plásmido pMT/Bip/V5-HisA (Invitrogen) para generar pMT/BiP/CHIK.sE2. La secuencia CHIK sE2 se situó en marco con una

secuencia BiP que dirige la proteína recombinante al camino secretor. En el vector de expresión, la secuencia CHIK.sE2 va seguida en su término C por el epítipo V5 y 6 histidinas para purificación por afinidad utilizando cromatografía de afinidad con quelato de níquel. Las células S2 de *Drosophila* (Invitrogen) se transfectaron con el plásmido recombinante pMT/BiP/CHIK.sE2 utilizando el Kit de Transfección con Fosfato de Calcio (Invitrogen). Las células transfectadas de manera estable se seleccionaron por adición de 25 µg/mL de blasticidina durante varias semanas. Las células S2 cultivadas que expresaban la proteína CHIK.sE2 se adaptaron en medio de cultivo exento de suero que contenía 10 µg/mL de blasticidina. Se añadió CuSO₄ a una concentración final de 500 µM para inducir la síntesis y secreción de proteína CHIK.sE2 recombinante soluble. La acumulación de CHIK.sE2 en el medio de cultivo era máxima 10 días después de la adición de CuSO₄. Los sobrenadantes del cultivo de células se sometieron a pases en filtros de 0,2 µm. Las muestras de proteína se concentraron en columnas Vivaspin de 10.000 -MWCo (Vivasciences) y se dializaron luego en PBS. Alternativamente, la proteína CHIK.sE2 recombinante se purificó a partir del sobrenadante del cultivo de células por cromatografía en columna equilibrada de formación de quelato (HiTrap_Chelating HP, Amersham). La columna se lavó varias veces con tampón de lavado (0,5 M NaCl, 50 mM tampón de fosfato de sodio, [pH 8.0]) y la CHIK.sE2 fijada se eluyó con concentración creciente de imidazol. Las fracciones que contenían las proteínas CHIK.sE2 se agruparon y se dializaron en PBS. La forma soluble de DEN-1, glicoproteína E (DEN-1.sE) se produjo también en células S2 de *Drosophila*.

Ensayos de clasificación cinética

Los ensayos de clasificación cinético se realizaron en un instrumento ProteOn XPR36 (Bio-Rad) y el análisis de los datos se realizó utilizando Software ProteOn Manager (Bio-Rad). Se inmovilizó IgG anti-ratón (Sigma) en un SensorChip GLM (Bio-Rad) utilizando una química estándar de acoplamiento de amina. El tampón de ejecución TPBS (0,005% Tween-20 en PBS) se utilizó continuamente a todo lo largo del experimento a 25°C. Resumidamente, se inyectaron 0,2 mL de una mezcla de 0,2 M EDC y 0,05 M Sulfo-NHS a una tasa de flujo de 0,030 mL.min⁻¹, seguido por 0,2 mL de 0,075 mg.mL⁻¹ IgG anti-ratón diluido en tampón de acetato de sodio 10 mM a pH 4,5. La superficie se desactivó luego con 0,15 mL de 1 M etanolamina de pH 8,5. Los sobrenadantes de hibridoma diluidos 1:2 en TPBS suplementado con 1 mg.mL⁻¹ de alginato se inyectaron en 0,2 mL a una tasa de flujo de 0,025 mL.min⁻¹, seguido por 0,2 mL de concentraciones crecientes de proteína CHIK.sE2 recombinante soluble.

30 ELISA indirecto

Para el ELISA indirecto, se cubrió una placa Maxisorp (Nalgen Nunc), con 10⁵ FFU de viriones CHIK purificados en sacarosa diluidos en D-PBS (Invitrogen), 50 ng de antígenos CHIK utilizados para inmunizaciones o 50 ng de proteína CHIK.sE2 recombinante soluble y se incubaron durante una noche a 4°C. Los sitios inespecíficos de fijación de proteína se bloquearon con leche al 3% en PBS durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron con PBS que contenía 0,1% de Tween-20 (PBST). Se añadieron sueros de ratones inmunizados, diluidos serialmente en PBST, leche al 0,1% y sobrenadantes de cultivo de células 1:2, diluidos en el mismo tampón, y se incubaron a 37°C durante 2 horas en las placas recubiertas. Después de lavado con PBST, se añadió una IgG anti-ratón de cabra AffiniPure conjugada con peroxidasa diluida en ratio 1:5000 (H+L) (Jackson ImmunoResearch) que contenía leche al 1% durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, se añadió sustrato base de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, KPL). La reacción coloreada se paró con 0,1 mL de 1 M H₃PO₄, a cada pocillo, y los platos se examinaron a 450 nm en un lector ELISA OpsysMR (Dinex Technologies).

45 ELISA de captura de antígeno

Para preparar el MAb de detección, los MAb purificados se marcaron con peróxido-oxidoreductasa (POD) en el grupo amina del anticuerpo como se ha descrito previamente (Nakane y Kawaoi, 1974). El MAb purificado para la captura de antígeno se inmovilizó en placas Maxisorp (Nalgen Nunc) por incubación de 2 µg.mL⁻¹ de anticuerpo en 0,1 mL de tampón de carbonato [pH 9,2] durante una noche a la temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron luego dos veces con TPBS, seguido por bloqueo con 8% (p/v) de sacarosa en PBS suplementado con leche desnatada al 3% durante 1 hora a 37°C. Después de separar el agente de bloqueo, se desecaron las placas durante 10 min a 50°C, se secaron los pocillos y se guardaron a 4°C antes de su utilización. Se añadió sobrenadante de cultivo de virus o proteína CHIK.sE2 recombinante soluble diluida en PBST con 1% de leche desnatada a los pocillos (0,1 mL/pocillo) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de varios lavados, los pocillos se incubaron durante 1 hora a 37°C con 1 µg.mL⁻¹ por pocillo de MAb conjugado a POD (0,1 mL/pocillo) en PBST con 1% de leche desnatada. Después del lavado, se añadió sustrato de TMB y las placas se incubaron adicionalmente en la oscuridad durante 8 min. La actividad enzimática se midió como se ha descrito arriba.

60 Análisis de inmunotransferencia

Las muestras de proteína mezcladas con tampón de muestra de Laemmli a la temperatura ambiente se cargaron en la SDS-PAGE al 4-12% (NuPage, Invitrogen). Las muestras se sometieron a electrotransferencia en una membrana PVDF (Invitrogen) se bloquearon con 5% de leche en PBST. La membrana se sondó con anticuerpo primario y los anticuerpos fijados se detectaron por anticuerpo secundario conjugado a POD a dilución 1:10.000, seguido por soluciones de sustrato ECL (Amersham).

Ensayo IF y análisis de citometría de flujo

5 Para el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IF) células que habían crecido en cámaras Pemanox Labtek (Nunc) se fijaron con 3,2% de paraformaldehído (PFA) en PBS durante 20 min y se incubaron luego con 50 mM NH₄Cl en PBS durante 10 min. Las células se permeabilizaron o no con 0,1% Triton X-100 en PBS durante 4 min y se incubaron luego con anticuerpo primario en PBS/0,2% gelatina a 37°C durante 30 min. Después de lavado extenso con PBS, las células se incubaron adicionalmente con IgG anti-ratón de cabra conjugado con fluoresceína (Pierce) a dilución 1:100 en PBS/0,2% gelatina a 37°C durante 30 min. Las muestras se observaron por microscopía de fluorescencia.

15 Para la fluencia por citometría de flujo, las células se despegaron y se fijaron luego con 3,2% PFA en PBS. Las células fijadas se lavaron prolongadamente con tampón de tinción SB (0,1% p/v) acida de sodio en 1% FBS; pH 7,5), y se incubaron con anticuerpo primario diluido en SB o en tampón de permeabilización PB (tampón SB suplementado con 1% [p/v] saponina) a 37°C durante 90 min. Después de lavado prolongado, las células se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína (Pierce) diluido en ratio 1:100 en SB o PB a 37°C durante 1 hora. Después de lavado prolongado, las células se analizaron por citometría de flujo utilizando un FACSCalibur (Becton Dickinson) con software CellQuest Pro (BD Biosciences).

20 RESULTADOS

Producción de antígenos CHIK E2

25 Con objeto de producir antígenos virales, se precipitaron viriones CHIK a partir de sobrenadantes de células de mosquito infectadas por la cepa 06-49 de la isla La Reunión de virus CHIK (CHIK.06-49). Se incubaron concentraciones altas de partículas de virus con 2% Triton X-100 y se aplicaron suspensiones virales a un gradiente de sacarosa. Después de centrifugación, las fracciones se evaluaron por análisis Immunoblot. Los anticuerpos anti-CHIK detectaron pE2, C y en mucho menor proporción E2 a aproximadamente 15-20% de concentración de sacarosa. Las fracciones enriquecidas en pE2, E2 y C se reunieron y se trataron con U.V. a fin de llevar a cabo la inmunización de los ratones en un laboratorio BSL-2. Como se evaluó por tinción con Azul Coomassie de SDS-PAGE y de inmunotransferencia (Fig. 1), la banda principal observada después de separación de antígenos virales correspondía a pE2. La antigenicidad de la preparación viral se confirmó por ELISA indirecto utilizando fluidos de ascitis de ratón preinmune anti-CHIK (HMAF) (datos no presentados). Como controles negativos, sueros inmunes de ratón dirigidos contra el virus dengue (DEN) o el virus del Nilo Occidental no acusaban reactividad alguna.

35 Dado que los antígenos de arbovirus producidos en células S2 de *Drosophila* podían asemejarse a sus contrapartidas nativas de mosquito, los inventores expresaron glicoproteína CHIK E2 utilizando el Sistema de Expresión de *Drosophila* (Invitrogen). Se ha establecido un linaje de células S2 transfectadas de manera estable que expresan el ectodominio seguido por el vástago de E2 del virus CHIK.06-49 (designado en lo sucesivo CHIK.sE2). La adición de CuSO₄ al medio de cultivo inducía la síntesis y secreción de la proteína recombinante soluble CHIK.sE2. La acumulación de CHIK.sE2 en el medio de cultivo era máxima 2 semanas después de la inducción. Para ELISA indirecto, proteínas CHIK.sE2 secretadas se concentraron directamente a partir de los sobrenadantes y se utilizaron para recubrir las placas ELISA. Para el análisis de inmunotransferencia y el ELISA de captura de antígeno, se purificó proteína recombinante soluble CHIK.sE2 a partir del medio de cultivo de células utilizando cromatografía de afinidad con quelato de níquel.

50 El análisis de inmunotransferencia demostró que la proteína recombinante soluble CHIK.sE2 (peso molecular aparente de 42 kDa) era reconocida por multi-CHIK HMAF y suero de pacientes CHIK-positivo (Fig. 2). Se observaron resultados similares utilizando ELISA indirecto (datos no presentados). Estos resultados sugieren que la proteína recombinante soluble CHIK.sE2 secretada por las células S2 tiene una conformación que está más próxima a la forma nativa de la glicoproteína CHIK. E2.

Producción de MAbs dirigidos contra la proteína CHIK E2

55 Se realizaron con éxito dos fusiones utilizando células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con preparación viral como se describe en las secciones Materiales y Métodos. Para cribado de los clones de hibridoma productores de anticuerpos, una preparación viral y proteína recombinante soluble CHIK.sE2 como antígenos CHIK en ELISA indirecto. Se identificaron aproximadamente 60 clones de hibridoma productores de anticuerpos como fijadores de anticuerpos que eran al menos 4 veces mayores que el nivel de reactividad de ruido de fondo de suero de bovino fetal (FBS). Doce de los 60 clones de hibridoma eran capaces de reaccionar con los viriones CHIK purificados con sacarosa así como proteína recombinante soluble CHIK.sE2 por ELISA indirecto (datos no presentados). Después de cribado por ensayo IF, 5 clones de hibridoma productores de anticuerpos (3C3, 3E4, 5A8, 6F2 y 8A4) exhibían reacción positiva fuerte contra las células infectadas con el virus CHIK (datos no presentados). El análisis con biosensor ProteOn demostró que los 5 clones reconocían CHIK.sE2 con alta afinidad de fijación aparente (Fig. 3).

65 Tres de 5 clones de hibridoma productores de anticuerpos (3C3, 3E4 y 8A4) exhibían asociación rápida y disociación

lenta de la proteína CHIK.sE2 recombinante soluble (datos no presentados). Conforme a estos resultados, los clones de hibridoma productores de anticuerpos 3C3, 3E4 y 8A4 han sido subclonados y expandidos posteriormente. Los experimentos siguientes se realizaron utilizando MAb anti-CHIK.E2 purificados a partir de los sobrenadantes de clones de hibridoma.

5

Las características de los MAb 3C3, 3E4 y 8A4 se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Características de MAb anti-CHIK.E2

Mab	Isotipo	Ensayo IF	ELISA Indirecto		Inmunotransferencia	
			Virus CHIK	CHIK.sE2	Virus CHIK	CHIK.sE2
3C3	IgG1, κ	+	+	+	+	+
3E4	IgG1, κ	+	+	+	+	+
8A4	IgG1, κ	+	+	+	-	+

10

Los tres MAb anti-CHIK.E2 eran de la subclase IgG1, κ . Se utilizaron tests de neutralización por reducción de foco (FRNT) para evaluar la capacidad de los MAb anti-CHIK.E2 purificados para inhibir la replicación del virus CHIK en células Vero cultivadas. El título de punto final se calculó como la dilución máxima de anticuerpos testada que reducía ~ 100 Unidades de Formación de Foco en células AP61 (FFU) de virus CHIK.06-49 al menos un 90% (FRNT90). Mientras que el anti-CHIK HMAF daba un FRNT90 de los medios de dilución 1:2500, ni MAb 3C3, MAb 3E4, ni MAb 8A4 neutralizaban el virus CHIK a una concentración tan alta como 10 $\mu\text{g} \cdot \text{ML}^{-1}$ (datos no presentados).

15

Reactividad de MAb anti-CHIK.E2 con la forma nativa de la glicoproteína CHIK E2

20

Se realizaron tests ELISA indirectos sobre el virus CHIK para evaluar si los MAb anti-CHIK.E2 seleccionados reconocen la superficie del virión. Con este objetivo, se utilizó el virus CHIK.06-49 purificado con sacarosa para recubrir las placas ELISA a 10⁵ FFU por pocillo y se añadieron concentraciones crecientes de MAb. Los MAb 3C3, 3E4 y 8A4 reaccionaban con las partículas de virus nativas en ELISA indirecto (Fig. 4), lo que sugería que sus epítopos estaban expuestos en la superficie exterior del virus CHIK. Para analizar la capacidad de fijación de los tres MAb anti-CHIK.E2 en condiciones detergentes, el virus CHIK se incubó con 2% Triton X-100 y se aplicó luego como recubrimiento sobre las placas ELISA. Únicamente MAb 8A4 exhibía reactividad importante con el virus CHIK en condiciones desnaturalizantes (datos no presentados), lo que indicaba que el MAb 8A4 es capaz de reconocer la glicoproteína CHIK E2 en presencia de detergente no iónico.

25

30

En el ELISA indirecto, las respuestas dosis-curva demostraban que MAb 8A4 y 3E4 se fijaban mejor al virus CHIK que lo hacía MAb 3C3 (Fig. 4). Como se estimó por este test de detección de antígeno, la reactividad de MAb 3C3 era diez veces menor comparada con MAb 8A4 y 3E4. Para evaluar si los pares de MAb anti-CHIK E2 pueden ser útiles para un ensayo sándwich, se realizó un estudio de complementariedad sobre la proteína CHIK.sE2 recombinante soluble por análisis con biosensor ProteOn. MAb 3C3 y 3E4 exhibían reactividad significativa con CHIK.sE2 fijado a MAb 8A4, y el resultado óptimo se obtuvo cuando se utilizó MAb 3E4 como anticuerpo de detección (datos no presentados). Así pues, la combinación de MAb 8A4 anti-CHIK.E2 (anticuerpo de captura) y 3E4 (anticuerpo de detección) es adecuada para el desarrollo de ELISA de captura de antígeno.

35

40

La capacidad de fijación de MAb a la glicoproteína CHIK E2 se investigó ulteriormente por ensayo IF (Fig. 5A) y análisis de citometría de flujo (Fig. 5B). Se utilizó HMAF anti-CHIK como control positivo. En el ensayo IF, los MAb 3C3, 3E4 y 8A4 reaccionaban fuertemente con las proteínas E2 sintetizadas endógenamente en células Vero infectadas con el virus CHIK (Fig. 5A). Como control negativo, el MAb 4E11 anti-DEN E no exhibía reactividad alguna (datos no presentados). La totalidad de los tres MAb anti-CHIK.E2 reconocían la glicoproteína CHIK E2 transportada a la PM (Fig. 5A, - TX-100), lo que sugería que sus epítopos están accesibles en la cara exterior de E2. Por análisis de citometría de flujo, MAb 3C3 y 3E4 exhibían valores medios similares de intensidad de fluorescencia en células Vero infectadas por el virus CHIK permeabilizadas o no con saponina (Fig. 5B). Así pues, ambos MAb anti-CHIK.E2 son capaces de reconocer moléculas E2 recién sintetizadas análogamente y E2 asociadas a PM.

45

El análisis por citometría de flujo reveló que la reactividad de MAb 8A4 anti-CHIK.E2 era distinta de MAbs 3C3 y 3E4. De hecho, MAb 8A4 exhibía una reactividad más débil con las células infectadas por el virus CHIK en presencia de saponina (Fig. 5B). Dado que MAb 8A4 está direccionado preferentemente a E2 asociado a PM, es probable que su epítipo esté expuesto predominantemente en la cara externa de la forma nativa de E2.

5

Reactividad por inmunotransferencia de MAbs anti-CHIK.E2

Se realizó una inmunotransferencia con viriones CHIK purificados con sacarosa y proteína recombinante soluble CHIK.sE2 a fin de determinar si los MAbs anti-CHIK.E2 se fijaban a epítopos lineales (Fig. 6). Como control positivo, se sondó HMAF anti-CHIK a E2 y CHIK.sE2 asociados al virus. Los inventores observaron que los MAbs 3C3 y 3E4 eran capaces de reaccionar con E2 en las condiciones reductoras. Para determinar si estos MAbs reconocen epítopos de péptidos lineales, se preparó un sistema de péptidos 15-meros solapantes inmovilizados que cubrían la secuencia entera de aminoácidos de CHIK.sE2, por medio de la técnica SPOT. Los péptidos sintéticos lineales eran incapaces de formar epítopos para los dos MAbs anti-CHIK.E2 (datos no presentados). Estos resultados sugieren que los MAbs 3C3 y 3E4 reconocían epítopos parcialmente lineales.

10

15

El MAb 8A4 anti-CHIK.E2 no lograba reaccionar con la proteína E2 asociada al virus CHIK en análisis de inmunotransferencia (Fig. 6), lo que sugería que este MAb podría reconocer un epítipo de conformación. Si bien MAb 8A4 produce una reacción más débil con CHIK.sE2 en las condiciones reductoras comparado con los MAbs 3C3 y 3E4, el mismo exhibía reactividad con dos bandas de proteína adicionales con pesos moleculares estimados de aproximadamente 100 y 150 kDa (Fig. 6, MAb 8A4, pista 1). Dicha observación sugiere que MAb 8A4 tiene la capacidad de detectar formas trímeras de E2 soluble.

20

Reactividad cruzada de los MAbs anti-CHIK.E2 con alphavirus del Viejo Mundo

25

Se realizaron ensayos IF sobre células de mosquito infectadas para evaluar si los tres MAbs anti-CHIK.E2 reconocen el virus SIN y miembros afines del serocomplejo SF aislado en el Viejo Mundo tales como los virus SF, Igbo-Ora, ONN, Babanki, Zingilamo, Milddelburg, Ndumu, y Arv9/71. La Tabla 2 resume la reactividad cruzada de los MAbs: los HMAF anti-CHIK mostraron un alta reactividad con la cepa CHIK S27, la cepa Igbo-Ora IBH10964, la cepa ONN Gulu (ONN-59), la cepa AnB1245d Zingilamo y la cepaSF IPD/A; actividad moderada con la cepa SIN Ar399; actividad débil con la cepa ARy251 Babanki y ninguna reactividad cruzada con la cepa SAAr749 Milddelburg, la cepa SAAr2204 Ndumu y el virus Arv9/71. La reactividad de los MAbs anti-CHIK.E2 en el test de anticuerpos fluorescentes era distinta de HMAF anti-CHIK. Como se muestra por los resultados de los ensayos IF, MAbs 3C3, 3E4, y 8A4 reaccionaban con el virus CHIK y en menor proporción el virus Igbo-Ora (Tabla 2). En el ensayo IF, MAb 8A4 exhibía reactividad similar con células de mosquito infectadas con el virus CHIK o el virus Igbo-Ora.

30

35

Tabla 2: Reactividad cruzada de los MAbs anti-CHIK.E2 con alphavirus utilizando el ensayo IF

Virus ^a	Anticuerpos			
	anti-CHIK HMAF ^b	MAB 3C3 ^c	MAB 3E4 ^d	MAB 8A4 ^c
CHIK	++	++	++	++
Igbo-Ora	++	+	+	++
ONN	++	-	-	-
Zingilamo	++	-	-	-
SF	+	-	-	-
SIN	+	-	-	-
Babanki	(+/-)	-	-	-
Middelburg	-	-	-	-
Ndumu	-	-	-	-
Arv9/71	-	-	-	-

a. Test de anticuerpos fluorescentes. Células AP61 infectadas se fijaron 24 horas después de la infección con PFA, se permeabilizaron con Triton X-100 y se sometieron a inmunotinción como se describe en Métodos. (++) señal de fluorescencia fuerte, (+) moderada, y (+/-) baja. (-) Ausencia de reacción positiva. CHIK: *Chikungunya*, ONN: O'nyong-nyong, SF: Bosque de Semliki, SIN: Sindbis.

b. Suero inmune de ratón a dilución 1:500

c. La concentración de anticuerpos se ajustó a 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

d. La concentración de anticuerpos se ajustó a 3,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

La alineación de las secuencias de aminoácidos del ectodominio y la región del vástago de E2 (E2-1 a E2-364) para el virus CHIK.06-49, el virus ONN-59 (nº de acceso a GenBank [M20303](#)) y la cepa 10964 de Igbo-Ora IBH (nº de acceso a GenBank [AF079457](#)) se muestra en Fig. 7. Los dos sitios de glicosilación enlazados a N identificados en las posiciones 263 y 345 están conservados en los virus CHIK, ONN, e Igbo-Ora. El análisis genético sobre los 365 primeros residuos de E2 identificó sólo 5 diferencias de aminoácido (98,5% de identidad) entre las cepas de virus Igbo-Ora y ONN (Fig. 7). Existen 45 diferencias de aminoácidos (87,5% de identidad) entre el virus CHIK y los otros dos miembros afines del complejo antigénico SF. El análisis comparativo de las secuencias E2 demostró que ONN-59 difiere de los virus CHIK.06-49 e Igbo-Ora IBH 10.964 en las posiciones E2-130, E2-164, y E2-288 (Fig. 7, marcos abiertos). Curiosamente, la sustitución Thr164Ala mapea a la región E2-160-177 estrictamente conservada en los virus CHIK e Igbo-Ora. Esta región rica en prolina podría estar expuesta en la superficie del pico E2 en el alfavirión (Mukhopadhyay *et al.*, 2006).

ELISA de captura de antígeno basado en MABs anti-CHIK.E2

Como se ha expuesto anteriormente, los MABs 8A4 y 3E4 anti-CHIK.E2 son adecuados para detección del virus CHIK en un ELISA sándwich. Se utilizó MAB 8A4 ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) como anticuerpo de captura en las placas ELISA y MAB 3E4 ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) conjugado a peroxidasa como anticuerpo de detección. Para determinar la sensibilidad del ELISA de captura de anticuerpo, se utilizaron diluciones seriadas de CHIK.06-49 cultivadas en células AP61 de mosquito o 293A humanas para determinar curvas estándar (Fig. 8A). Se utilizó DPBST/leche al 1% para determinar la línea basal para captura de antígeno a una densidad óptica de 0,15 a 450 nm. De este modo, el valor de punto de corte para la detección de virus CHIK diluidos en DPBST/leche al 1% se ajustó a 0,45, lo que es igual al valor medio +3 desviaciones estándar (S.D.) de la DO450 para DPBST/leche al 1%. Conforme al umbral de punto de corte, el límite de detección del ELISA era aproximadamente $10^{6.0}$ AP61FFU del virus CHIK derivado de células de mosquito y $10^{4.3}$ FFU de virus CHIK derivado de células humanas (Fig. 8A). El ELISA de captura de antígeno era capaz también de detectar E2 en su forma soluble (CHIK.sE2) y la masa detectable mínima era aproximadamente 5 ng (Fig. 8B). El

par de MAbs anti-CHIK.E2 tiene nivel de reactividad mayor con el virus CHIK activado en células 293A en comparación con las células de mosquito (Fig. 8A). Esto podría estar relacionado con la liberación de glicoproteínas E2 individualizadas en sobrenadantes de células humanas infectadas por el virus CHIK citopático. Los resultados muestran que los MAbs 8A4 y 3E4 pueden emplearse en combinación para detectar la proteína CHIK E2 soluble así como la proteína E2 asociada al virión en el sobrenadante de cultivo de virus.

Existen dos genotipos de virus CHIK distintos en África (revisado por Powers y Logue, 2007). El primer genotipo comprendía aislados del virus CHIK de África Occidental. El segundo genotipo agrupaba aislados del virus CHIK de África Oriental/Central/Meridional. Para determinar la especificidad del par de MAbs anti-CHIK.E2, se realizaron tests ELISA de captura de antígeno sobre un panel de aislados clínicos de virus CHIK obtenidos de África Central/Oriental (República Centroafricana, 1978; Océano Índico, 2005-06) y África Occidental (Costa de Marfil, 1999; Senegal, 1965-66 y 2005). Todas las cepas africanas de virus CHIK testadas cultivadas en células de mosquito se reconocieron (datos no presentados). Así pues, la combinación de MAbs 8A4 y 3E4 es capaz de reconocer epítomos en E2 que están conservados a través de los genotipos de virus CHIK de África Occidental y Central/Oriental. Para definir adicionalmente la especificidad de la combinación de MAbs anti-CHIK.E2, se realizó un ELISA de captura de antígeno sobre alphavirus afines. Los resultados eran similares a los de ELISA indirecto. Los MAbs 8A4 y 3E4 en sándwich se fijaban a la cepa CHIK.06-49 y también en menor proporción a la cepa Igbo-Ora IBH 10.964, pero no reaccionaban cruzadamente con la cepa ONN-59 u otros miembros afines del complejo antigénico SF aislado en África o Asia (datos no presentados). En conjunto, estos datos demuestran que la combinación de los MAbs 8A4 y 3E4 anti-CHIK.E2 es adecuada en el diseño de ensayos sándwich para la detección del virus CHIK, y en menor proporción el virus Igbo-Ora.

DISCUSIÓN

En este estudio, se utilizó la cepa 06-49 del virus CHIK aislada en la isla La Reunión en 2006 para generar un panel de MAbs contra la glicoproteína CHIK E2 en ratones inmunizados. Este informe describe también una nueva glicoproteína CHIK E2 recombinante soluble. Los inventores expresaron CHIK.sE2 que corresponde al ectodominio de E2 de CHIK.06-49 seguido por su región vástago en células S2 de *Drosophila*. En este sistema de expresión, CHIK.sE2 se acumulaba en los sobrenadantes de los clones de células S2 inducidos de manera estable. Los ensayos ELISA indirecto y de inmunotransferencia demostraron que CHIK.sE2 era reconocido por anticuerpos específicos para el virus CHIK. Los inventores lograron desarrollar procedimientos de purificación que producían antígenos CHIK.sE2 altamente purificados. La proteína CHIK.sE2 purificada del sobrenadante de cultivo de células S2 es adecuada para detección fácil de anticuerpos específicos para el virus CHIK en los análisis ELISA indirecto y de inmunotransferencia.

Los inventores demostraron que tres MAbs anti-CHIK E2 (3C3, 3E4, y 8A4) tienen reactividad significativa con la glicoproteína E2 asociada al virus CHIK en ELISA indirecto. Dado que los MAbs 3C3, 3E4, y 8A4 reaccionan con E2 en el contexto de un virión CHIK intacto, sus epítomos están localizados probablemente en la superficie del virus. Sin embargo, la totalidad de los tres MAbs fallaba en lo referente a neutralizar la infección del virus CHIK de las células de primate *in vitro*. Aunque la fijación de los MAbs anti-CHIK.E2 al virus entero no inhibía la interacción viral con las células hospedadoras, es probable que sus epítomos no mapeen al dominio principal de neutralización de la glicoproteína E2 de CHIK.

Los resultados del análisis de inmunotransferencia demostraron que los MAbs 3C3 y 3E4 tienen reactividad importante con E2 asociado el virus CHIK y la glicoproteína recombinante soluble CHIK E2 en las condiciones reductoras. Estudios de inmunofluorescencia han demostrado que los dos MAbs anti-CHIK.E2 pueden detectar con éxito E2 recién sintetizado así como E2 asociado a PM en células de primate infectadas. Basándose en su reactividad con los antígenos CHIK, se supone que los epítomos reconocidos por MAbs 3C3 y 3E4 son al menos parcialmente lineales en la cara exterior de E2. La proteína soluble CHIK.sE2 que es capaz de reaccionar con los MAbs 3C3 y 3E4 podría ser útil como antígeno recombinante para el análisis de mapeado de epítomos. La evaluación de subfragmentos derivados de CHIK.sE2 para estudios de fijación en competencia está planificada. Bibliotecas de péptidos aleatorios presentados en fago son también aplicables probablemente a la identificación de epítomos para MAbs anti-CHIK.E2 (Davis *et al.*, 2000). En el análisis de inmunotransferencia, MAb 8A4 no lograba reconocer E2 asociado al virión de CHIK y exhibía una reactividad más débil con CHIK.sE2 comparado con MAb 3C3 o 3E4 en las condiciones reductoras. Los resultados del análisis por citometría de flujo demostraron que MAb 8A4 está direccionado predominantemente a E2 asociado a PM en las células infectadas por el virus CHIK. Los resultados del análisis de inmunotransferencia demostraron que MAb 8A4 podría reconocer formas homooligómeras de proteína E2 soluble. Aunque la estructura atómica de la glicoproteína E2 de CHIK está todavía por determinar, es probable que el epítopo reconocido por MAb 8A4 sea conformacional en la cara externa de la forma nativa de E2.

Los tres MAbs anti-CHIK.E2 exhibían reactividad cruzada con el virus Igbo-Ora pero no con la cepa ONN-59 como se determinó por ensayo IF. Los virus CHIK, ONN e Igbo-Ora están clasificados serológicamente en el complejo antigénico SF (revisado por Strauss y Strauss, 1994). El virus ONN fue aislado de muestras humanas en Uganda en 1959 (Haddow *et al.*, 1960) y el virus Igbo-Ora fue aislado de humanos en Nigeria en 1966 (Olaleye *et al.*, 1988,

1990). Se ha propuesto recientemente que el virus Igbo-Ora es una cepa de ONN (Lanciotti *et al.*, 1998; Powers *et al.*, 2000).

5 Los valores porcentuales de identidad de secuencia al nivel de aminoácidos de E2 indicaban que la cepa Igbo-Ora
 BH10964 está más estrechamente relacionada con la cepa ONN-59 que la cepa CHIK.06-49 aislada en la isla La
 Reunión en 2006 (Fig. 7). Dado que el residuo Thr164 de E2 ha mutado a Ala en la cepa Gulu del virus ONN aislada
 en 1959, la región estrictamente conservada E2 161-177 en los virus CHIK e Igbo-Ora (Fig. 7) podría formar parte
 del dominio antigénico para estos MAbs anti-CHIK.E2. De hecho, los residuos de esta región podrían participar en la
 punta del pico E2 de los heterodímeros E1-E2 que cubren la superficie del alfaviión (Mukhopadhyay *et al.*, 2006).
 10 Dado que la cepa SG 650 de ONN aislada en 1995 (ONN-95) posee un residuo treonina en la posición E2-164
 (Lanciotti *et al.*, 1998), estudios adicionales que emplearan ONN-95 podrían aportar posiblemente ideas acerca del
 papel de la región E2 160-177 en la fijación de MAbs anti-CHIK.E2.

15 La presencia de títulos altos de partículas de virus en el sobrenadante de cultivo del virus, así como la presencia de
 E2 en la superficie exterior del virión, y en la membrana plasmática sugieren que la detección de la infección por el
 virus CHIK podría estar basada en antígenos del virus. El anticuerpo monoclonal 8A4 está disponible para uso en la
 detección de un virión CHIK nativo y en la forma soluble de la glicoproteína CHIK E2. En el ELISA de captura de
 antígeno, el par de MAb 8A4 (anticuerpo de captura) y MAb 3E4 (anticuerpo de detección) era capaz de detectar al
 menos $10^{4.5}$ FFU de virus CHIK cultivado en células humanas. El límite de detección de este test era
 20 aproximadamente 5 ng de moléculas E2 solubles. El par de MAbs anti-CHIK.E2 tiene la reactividad cruzada para las
 cepas de África Central/Oriental y Occidental del virus CHIK y carece de reactividad con miembros afines del
 complejo SF, con la notable excepción del virus Igbo-Ora.

25 En conclusión, los inventores han generado y caracterizado tres MAbs 3C3, 3E4, y 8A4 reactivos con la
 glicoproteína CHIK E2. Tales MAbs son útiles para estudiar la biología del virus CHIK y la patogénesis de la fiebre
Chikungunya (Borgherini *et al.*, 2007; Ozden *et al.*, 2007; Sourisseau *et al.*, 2007). Los tres MAbs anti-CHIK.E2 son
 útiles en diagnósticos de la infección por el virus CHIK y los métodos de diagnóstico pueden incluir los ensayos de
 inmunotransferencia e inmunofluorescencia (revisado por Powers y Logue, 2007). Los datos presentes demostraron
 que los MAbs 8A4 y 3E4 se utilizan también en combinación para reconocer virus CHIK total así como la
 30 glicoproteína CHIK E2 soluble en ELISA de detección de antígeno. Dado que el título de virus infeccioso en sangre y
 tejidos es suficientemente alto para conducir a la diagnosis temprana de la fiebre Chikungunya (Santhosh *et al.*,
 2007), está claro que la combinación de los MAbs anti-CHIK.E2 8A4 (anticuerpo de captura) y 3E4 (anticuerpo de
 detección) es adecuada para desarrollar un sistema específico y sensible de detección de antígeno.

35 REFERENCIAS

- Arankalle, V. A., Shrivastava, S., Cherian, S., Gunjekar, R. S., Walimbe, A. M.,
 Jadhav, S. M., Sudeep, A. B. and Mishra, A. C., 2007. Genetic divergence of
 Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006

- explosive epidemic. *J. Gen. Virol.* 88, 1967-1976.
- Blackburn, N. K., Besselaar, T. G. and Gibson, G., 1995. Antigenic relationship between chikungunya virus strains and o'nyong nyong virus using monoclonal antibodies. *Res. Virol.* 146, 69-73.
 - Borgehrini, G., Poubeau, P., Staikowski, F., Lory, M., Le Moullec, N., Becquart, J-P., Wengling, C., Michault, A., and Paganin, F. 2007. Outbreak of Chikungunya on Reunion island: Early diagnosis and laboratory features in 157 adult patients. *J.Infect. Dis.* 44, 1401-1407
 - Davis, J.M., Cai, Y-P., Weir, R.C., Rowley, M.J. (2000). Characterization of epitopes for virus-neutralizing monoclonal antibodies to Ross River virus E2 using phage-displayed random peptide libraries. *Virology* 275, 67-76
 - Edwards, C.J., Welch, S.R., Chamberlain, J., Hewson, R., Tolley, H., Cane, P.A., and Lloyd, G. 2007. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. *J.Clin.Virol.* 39, 271-275
 - Epstein, P. R., 2007. Chikungunya Fever resurgence and global warming. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 403-404.
 - Greiser-Wilke, I. M., Moennig, V., Kaaden, O. R. and Shope, R. E., 1991. Detection of alphaviruses in a genus-specific antigen capture enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 29, 131-137.
 - Haddow, A.J. , Davies, C.W. and Walker, A.J., 1960. O'nyong nyong fever: an epidemic virus disease in East Africa. I. Introduction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 54, 517.
 - Johnston, R.E. and Peters, C.J., 1996. Alphaviruses associated primarily with fever and polyarthrits. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 843-898.
 - Lanciotti, R. S., Ludwig, M. L., Rwaguma, E. B., Lutwama, J. J., Kram, T. M., Karabatsos, N., Cropp, B. C. and Miller, B. R., 1998. Emergence of epidemic O'nyong-nyong fever in Uganda after a 35-year absence: genetic characterization of the virus. *Virology* 252, 258-268.
 - Laurent, P., Le Roux, K., Grivard, P., Bertil, G., Naze, F., Picard, M., Staikowsky, F., Barau, G., Schuffenecker, I. and Michault, A., 2007. Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus. *Clin. Chem.* 53, 1408-1414.

- Mukhopadhyay, S., Zhang, W., Gabler, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Strauss, J. H., Baker, T. S., Kuhn, R. J. and Rossmann, M. G., 2006. Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in alphaviruses. *Structure* 14, 63-73.
- Nakane, P. K. and Kawaoi, A., 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084-1091.
- Olaleye, O. D., Omilabu, S. A. and Fagbami, A. H., 1988. Igbo-Ora virus (an alphavirus isolated in Nigeria): a serological survey for haemagglutination inhibiting antibody in humans and domestic animals. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 905-906.
- Olaleye, O. D., Omilabu, S. A. and Baba, S. S., 1990. Growth of Igbo-Ora virus in some tissue cultures. *Acta Virol.* 34, 367-371.
- Ozden, S., Huerre, M., Riviere, J. P., Coffey, L. L., Afonso, P. V., Mouly, V., de Monredon, J., Roger, J. C., El Amrani, M., Yvin, J. L., Jaffar, M. C., Frenkiel, M. P., Sourisseau, M., Schwartz, O., Butler-Browne, G., Despres, P., Gessain, A. and Ceccaldi, P. E., 2007. Human muscle satellite cells as targets of chikungunya virus infection. *PLoS ONE* 2, e527.
- Parida, M. M., Santhosh, S. R., Dash, P. K., Tripathi, N. K., Lakshmi, V., Mamidi, N., Shrivastva, A., Gupta, N., Saxena, P., Babu, J. P., Rao, P. V. and Morita, K., 2007. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 45, 351-357.
- Pialoux, G., Gauzere, B. A., Jaureguiberry, S. and Strobel, M., 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 319-327.
- Plenetv, S.V., Zhang, W., Mukhopadhyay, S., Fisher, B.R., Hernandez, R., Brown, D.T., Baker, T.S., Rossmann, M.G., and Kuhn, R.J. 2001. Location of carbohydrate sites on alphavirus glycoproteins show that E1 forms an icosahedral scaffold. *Cell* 105, 127-136
- Powers, A. M., Brault, A. C., Tesh, R. B. and Weaver, S. C., 2000. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J. Gen. Virol.* 81, 471-479.
- Rulli, N.E., Melton, J., Wimes, A., Ewartn G., and Mahalingam, S. 2007. The molecular and cellular aspects of arthritis due to alphavirus infection: lesson learned from Ross River virus. *Ann. N. Acad.Sci.* 1102, 96-108
- Schuffenecker, I., Iteman, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C.,

Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J. M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, M. P., Brehin, A. C., Cubito, N., Despres, P., Kunst, F., Rey, F. A., Zeller, H. and Brisse, S., 2006. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 3, e263.

- Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet, C., Guivel-Benhassine, F., Rudnicka, D., Sol-Foulon, N., Roux, K. L., Prevost, M. C., Fsihi, H., Frenkiel, M. P., Blanchet, F., Afonso, P. V., Ceccaldi, P. E., Ozden, S., Gessain, A., Schuffenecker, I., Verhasselt, B., Zamborlini, A., Saib, A., Rey, F. A., Arenzana-Seisdedos, F., Despres, P., Michault, A., Albert, M. L. and Schwartz, O., 2007. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. *PLoS Pathog.* 3, e89.
- Staikowsky, F., Le Roux, K., Schuffenecker, I., Laurent, P., Grivard, P., Develay, A. and Michault, A., 2007. Retrospective survey of Chikungunya disease in Reunion Island hospital staff. *Epidemiol. Infect.* 1-11.
- Strauss, J. H. and Strauss, E. G., 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 58, 491-562.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> INSTITUT PASTEUR
 BREHIN, Anne-Claire
 SALL, Amadou Alpha
 DESPRES, Philippe

10 <120> Anticuerpos monoclonales anti-chikungunya y usos de los mismos
 <130> 226EXT165
 <150> CA 2,598,966
 <151> 09-09-2007

15 <160> 5
 <170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> virus

25 <400> 1
 Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val
 20 25 30
 Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
 35 40 45
 Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
 50 55 60
 Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg
 65 70 75 80
 Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
 85 90 95
 Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
 100 105 110
 Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro
 115 120 125
 Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
 130 135 140
 Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
 165 170 175

ES 2 550 997 T3

Asp Arg Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
 180 185 190

Asn Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser Asn Glu
 195 200 205

Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln
 210 215 220

Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro
 225 230 235 240

Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His
 245 250 255

Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg
 260 265 270

Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr
 275 280 285

Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro
 290 295 300

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr
 305 310 315 320

Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr
 325 330 335

Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro
 340 345 350

His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro
 355 360

<210> 2
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> virus

<400> 2
 Asn Ala Arg Glu Asn Phe Asn Val Tyr Lys Val Thr Arg Pro Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Ile
 20 25 30

Ala Leu Glu Arg Ile Arg Ser Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
 35 40 45

5

10

ES 2 550 997 T3

Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Ala Asp Ser His Asp Trp
50 55 60

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Ser His Thr Pro Val Asp Ala Asp Arg
65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
85 90 95

Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
100 105 110

Val Gly Phe Val Asp Ser Arg Arg Ile Ser His Thr Cys Met His Pro
115 120 125

Phe His His Glu Pro Pro Leu Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
130 135 140

Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val His Thr Thr
145 150 155 160

Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
165 170 175

Asp Tyr Thr Leu Met Thr Gln Gln Ala Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
180 185 190

Asp Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Lys Cys Asp Gly Ser Asn Glu
195 200 205

Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln
210 215 220

Cys His Thr Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro
225 230 235 240

Leu Thr Pro Arg Asn Ser Glu Gln Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His
245 250 255

Ile Pro Phe Pro Leu Val Asn Thr Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg
260 265 270

Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Arg Val Thr Leu Leu Leu Tyr
275 280 285

Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Ala Met Gly Arg Ile Pro
290 295 300

Asp Tyr His Glu Glu Trp Ile Thr Ser Lys Lys Glu Ile Ser Ile Thr
305 310 315 320

ES 2 550 997 T3

Val Pro Ala Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Asp Pro Tyr
 325 330 335

Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro
 340 345 350

His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro
 355 360

<210> 3

<211> 364

<212> PRT

5 <213> virus

<400> 3

Asn Ala Arg Glu Asn Phe Asn Val Tyr Lys Val Thr Arg Pro Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Ile
 20 25 30

Ala Leu Glu Arg Ile Arg Ser Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
 35 40 45

Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
 50 55 60

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Ser His Thr Pro Val Asp Ala Asp Arg
 65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
 85 90 95

Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Gly Phe Val Asp Ser Arg Arg Ile Ser His Thr Cys Met His Pro
 115 120 125

Phe Arg His Glu Pro Pro Leu Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
 130 135 140

Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val His Thr Thr
 145 150 155 160

Ala Ala Thr Ala Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
 165 170 175

Asp Tyr Thr Leu Met Thr Gln Gln Ala Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
 180 185 190

Asp Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Lys Cys Asp Gly Ser Asn Glu

REVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal que se fija específicamente al virus CHIK entero, en donde el anticuerpo monoclonal se fija específicamente a un epítipo de la proteína CHIK E2 localizado en la superficie exterior de un virus CHIK y se selecciona del grupo depositado en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos) 28 rue du Docteur Ros, 75724 Paris Cedex 15, en fecha 6 de septiembre de 2007 bajo los números de acceso I-3824 (3E4), e I-3823 (8A4).
- 10 2. Un kit para detectar la presencia o ausencia de una cepa del *virus Chikungunya* (CHIK) o de un virus Igbo-Ora en una muestra, que comprende al menos un anticuerpo monoclonal conforme a la reivindicación 1.
3. Uso de un anticuerpo monoclonal conforme a la reivindicación 1 o una combinación de los mismos como reactivo de diagnóstico *in vitro*.

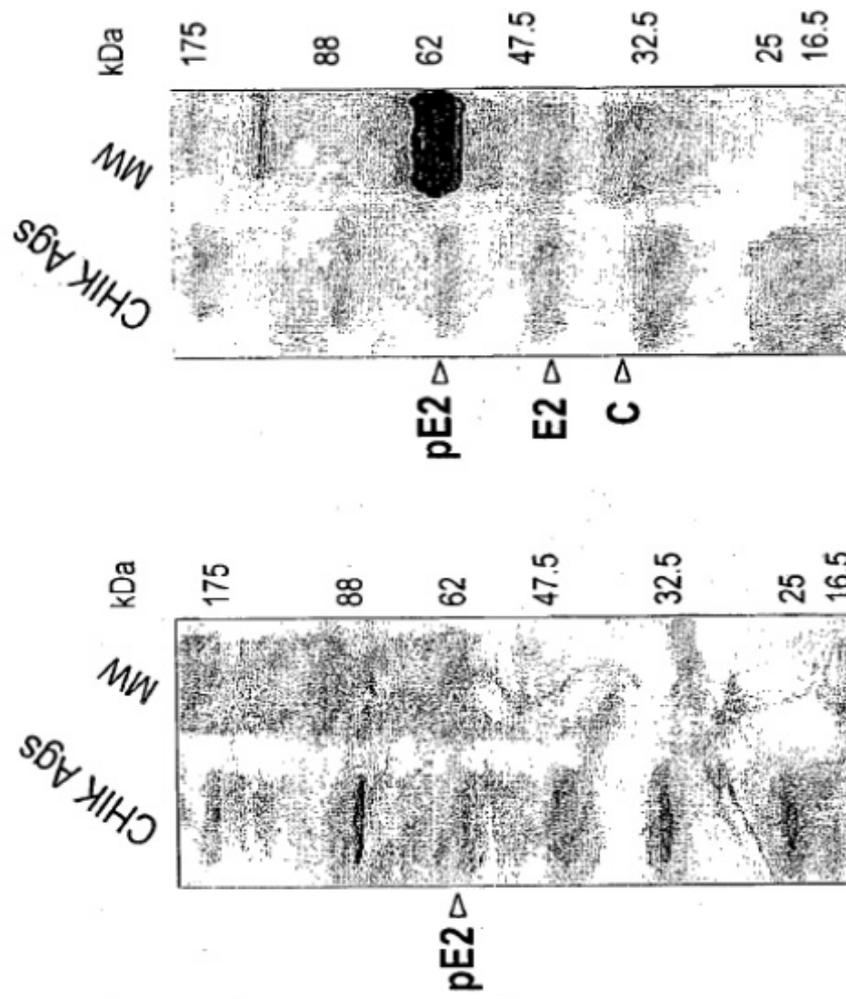


Figura 1

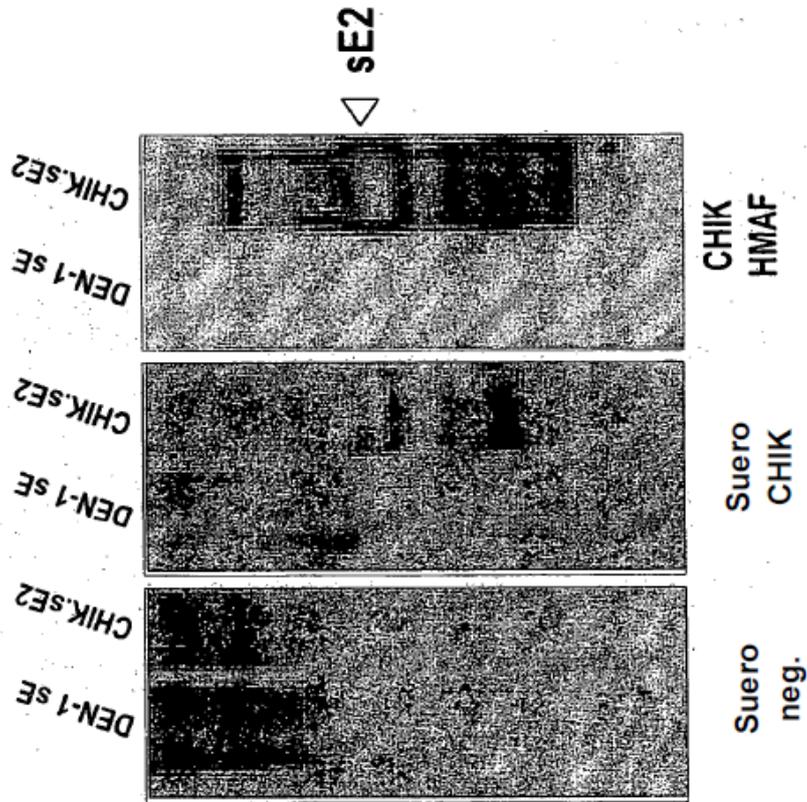


Figura 2

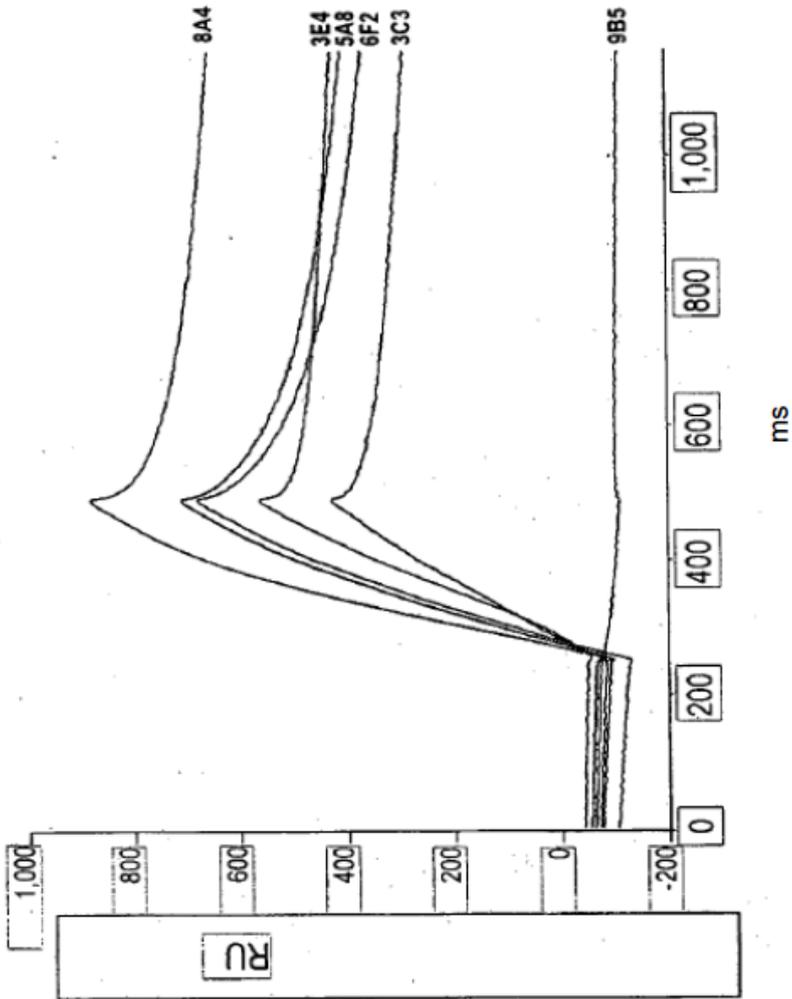


Figura 3

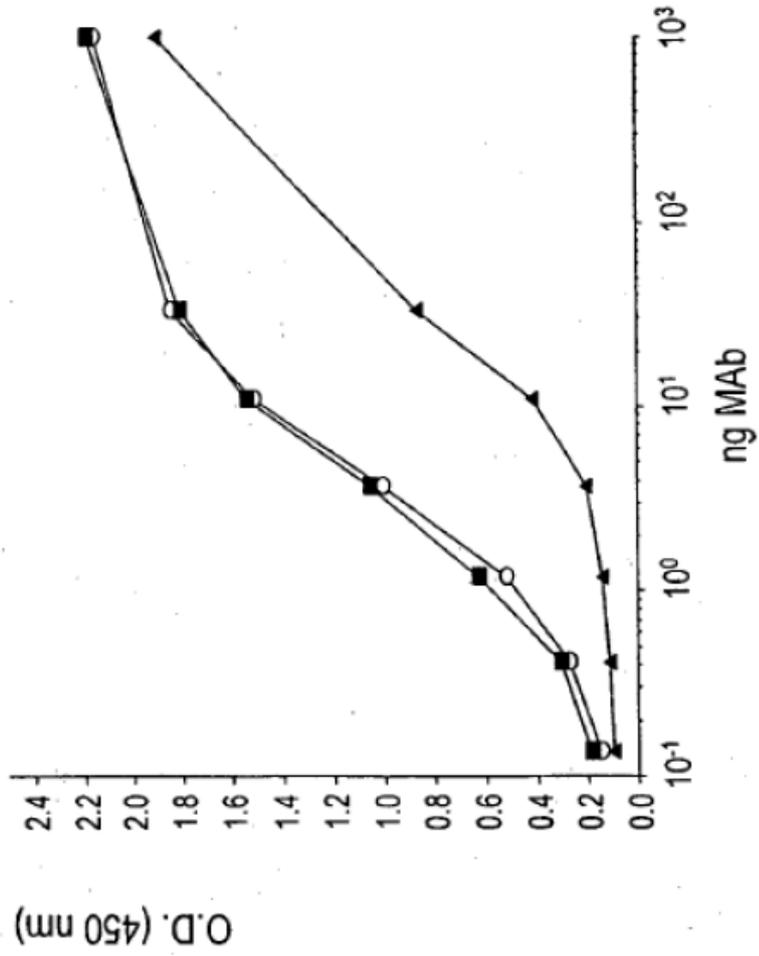


Figure 4

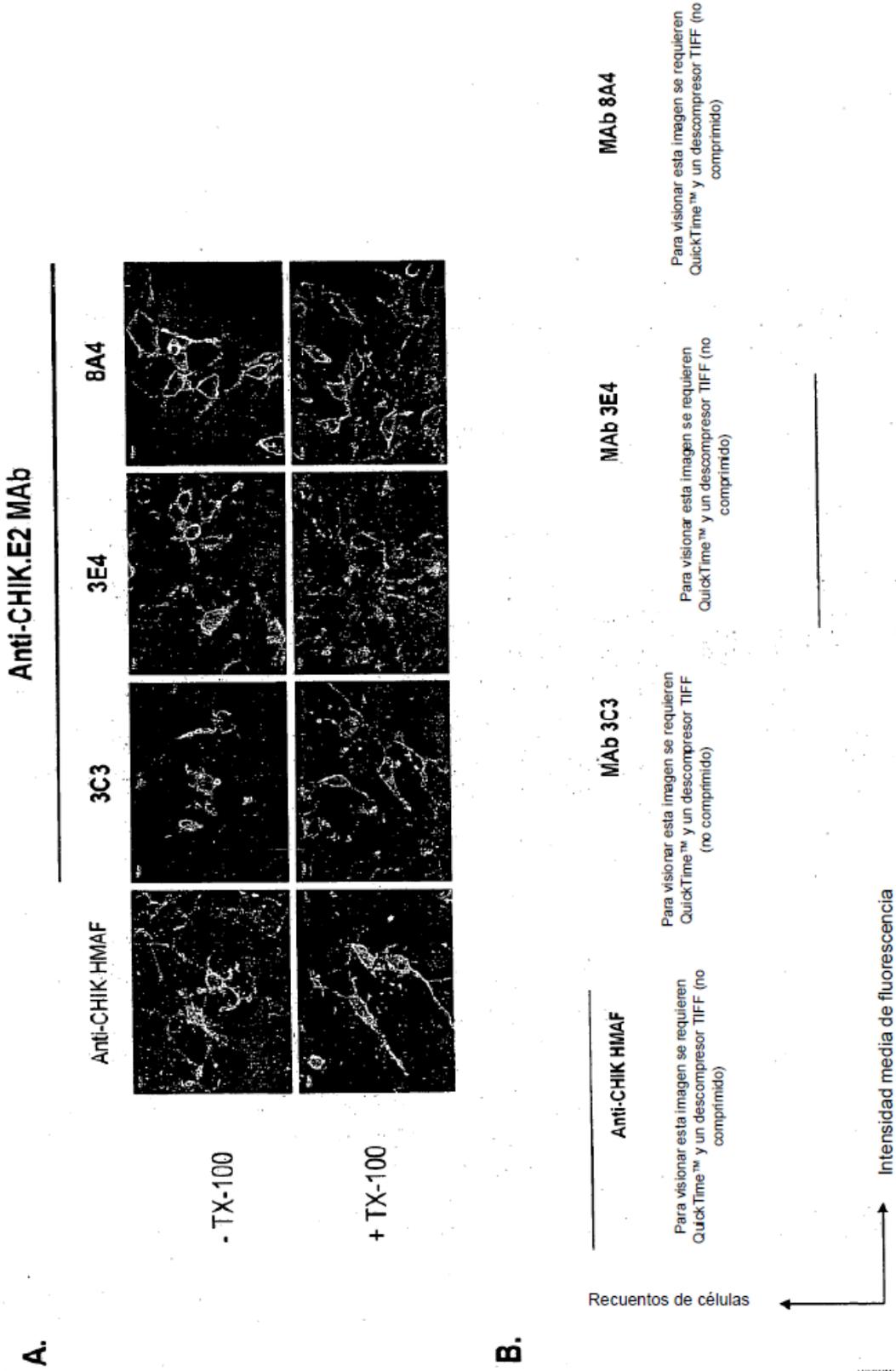


Figura 5

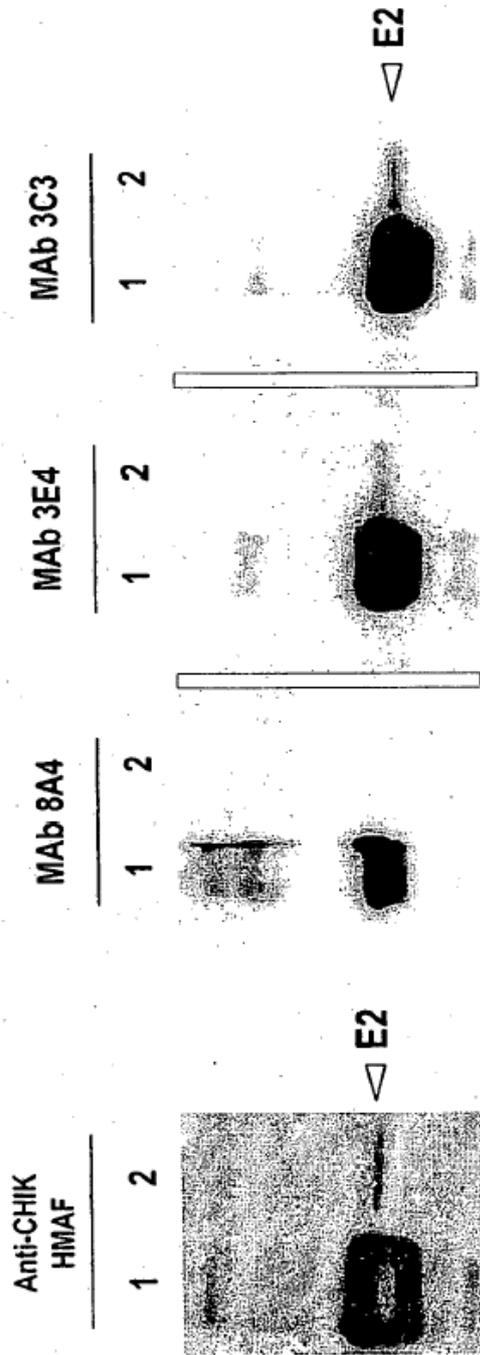


Figure 6

[1-50]	STKDNFNVYKATRPYL AHCPCDCGEGHSCSPVALERIRNEATDGLKIQV NARE-----V-----I-----S----- NARE-----V-----I-----S-----	CHIK.06-49 SEQ ID NO:1 Igbo-Ora IBH10964 SEQ ID NO:2 ONN-59 SEQ ID NO:3
[51-100]	SLQIGIKTDDSHDWTKLRYMDNHPADAERAGL FVRTSAPCTITGTMGHF -----A-----S-T-V--D-S----- -----S-T-V--D-S-----	CHIK.06-49 Igbo-Ora IBH10964 ONN-59
[101-150]	ILARCPKGETLVGFTDSRKISHSCTHPFHDPPIGREKFSRPQHGKE -----V--R--T-M--E-L----- -----V--R--T-M--R-E-L-----	CHIK.06-49 Igbo-Ora IBH10964 ONN-59
[151-200]	LPCSTYVQSTAATTEIEIEVHMPDTPDRILMSQQSGNVKITVNGQTVRYK -----HT-----Y-L-T--A--D----- -----HT-----A-----Y-L-T--A--D-----	CHIK.06-49 Igbo-Ora IBH10964 ONN-59
[201-250]	CNCGGSNEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHHKKWQYNSPLVPRNAELGD -----K-D-----T-----T--S-Q-- -----K-D-----T-----T--S-Q--	CHIK.06-49 Igbo-Ora IBH10964 ONN-59
[251-300]	RKGKIHIPFPLANVTCRVPKARNPTVYGKNQVIMLLYDPDHPTLLSYRNM -----V-T-----R-TL-----A----- -----V-T-----R-TL-----H-----A-----	CHIK.06-49 Igbo-Ora IBH10964 ONN-59
[301-350]	GEEPNYQEEWVMHKKEVLTVPTEGLEVTWGNNEP YKYWPQLSTNGTAHG -----RI-D-H-----ITS--SI--A-----D----- -----RI-D-H-----ITN--SI--A-----D-----	CHIK.06-49 Igbo-Ora IBH10964 ONN-59
[351-364]	HPHEIILYYEYELYP ----- -----	CHIK.06-49 Igbo-Ora IBH10964 ONN-59

Figura 7

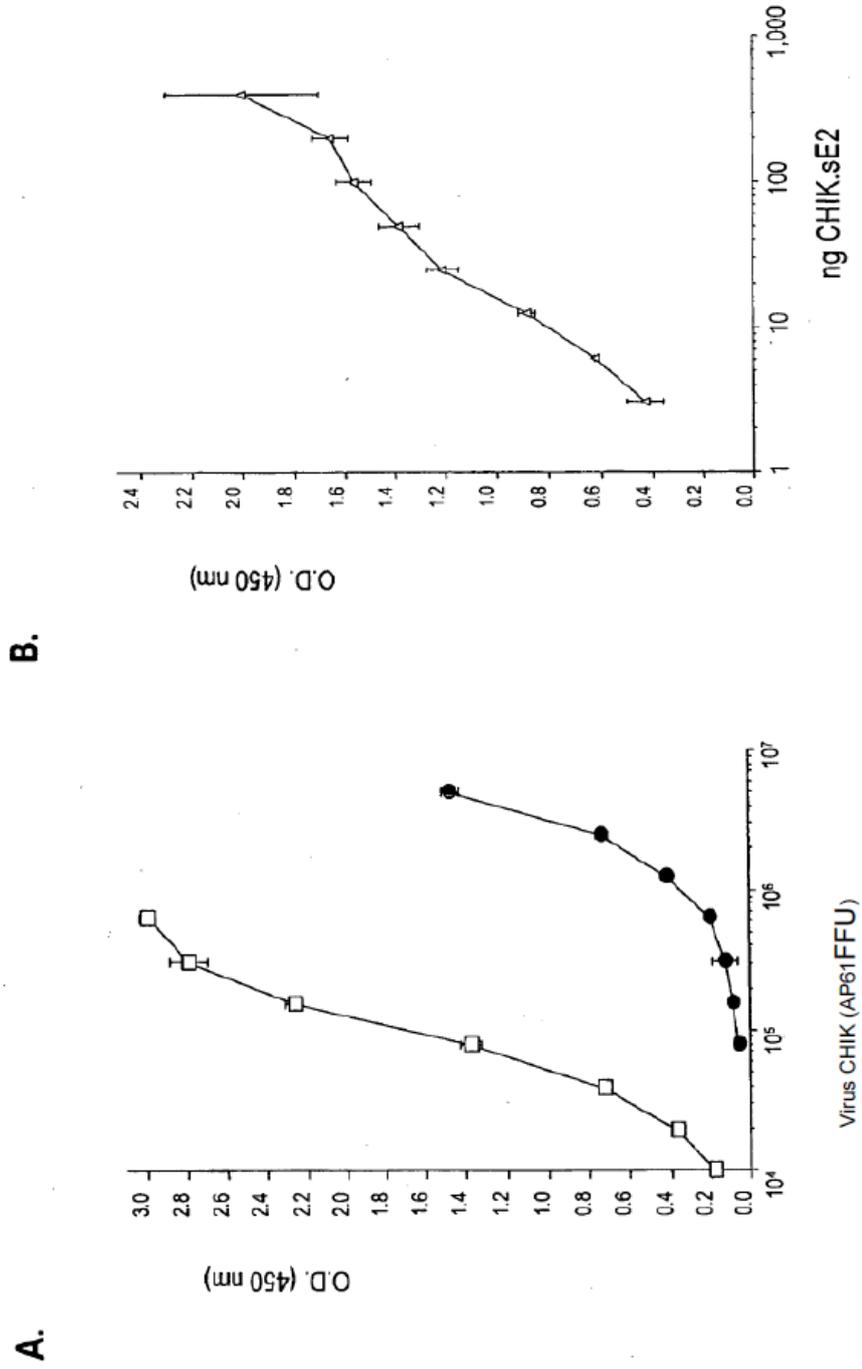


Figura 8