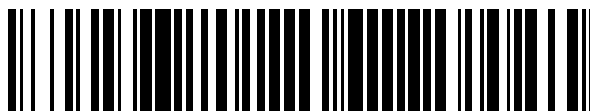


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 597**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2011 E 11306314 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2581387**

54 Título: **Un anticuerpo monoclonal anti-Tat del VIH-1**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (33.3%)
58, Boulevard Charles Livon
13284 Marseille, FR;
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LORET, ERWANN;
BAILLAT, GILBERT;
MEDIOUNI, SONIA;
WATKINS, JENNIFER DANIELE y
PIERRES, MICHEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 553 597 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

Un anticuerpo monoclonal anti-Tat del VIH-1

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal (mAb; del inglés, monoclonal Antibody) neutralizante contra la proteína extracelular "transactivador de la transcripción" (Tat; del inglés, trans-activator of transcription) del VIH-1.

Antecedentes técnicos

El tratamiento antiviral HAART (terapia antirretroviral muy activa; del inglés, highly active antiretroviral therapy) contra el VIH-1 se centra principalmente en la transcriptasa inversa y la proteasa, pero el HAART no erradica los virus en el ser humano ni siquiera con la nueva clase de agentes antivirales que se dirigen a la integrasa. Estudios de inmunización pasiva han demostrado el papel protector de los anticuerpos monoclonales (mAb) en el reto del virus de la inmunodeficiencia de seres humanos y simios (SHIV; del inglés, simian-human immunodeficiency virus) (R. M. Ruprecht, *Methods Mol. Biol.* 2009, 525: 559-66). En todos estos estudios se han empleado anticuerpos que se dirigen a la proteína Env del VIH-1 pero que no resultaron eficaces en pacientes humanos (W. Chen y D. S. Dimitrov, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2011). Entre otras posibles dianas proteicas del VIH-1, Tat parece la más atractiva a causa de sus funciones extracelulares (G. R. Campbell y E. P. Loret, *Retrovirology* 2009, 6: 50-62).

La proteína transactivador de la transcripción (Tat) del VIH-1 tiene diferentes funciones en el VIH-1. El Tat aumenta la transcripción de genes del VIH-1 en células infectadas, mientras que el Tat extracelular puede atravesar membranas y desencadena la apoptosis mitocondrial de células inmunes que deberían eliminar el virus (G. R. Campbell y E. P. Loret, *Retrovirology* 2009, 6: 50-62).

También se ha mostrado que Tat modula la propagación del VIH a causa de su interacción con la glicoproteína gp120 en la superficie celular (S. Marchio et al., *Blood* 2005, 105: 2802-11).

En los años 80 se identificó una variante de Tat, llamada Tat Oyi, de un individuo seropositivo en una zona remota de Gabón, individuo que no desarrolló el sida. Se clonó el VIH-1 Oyi y resultó que tiene genes similares a los de las cepas habituales del VIH-1 salvo el gen *tat*, que tiene mutaciones nunca halladas en otras variantes de Tat (C. J. Gregoire y E. P. Loret, *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 22.641-6). La inmunización de conejos con Tat Oyi generó anticuerpos capaces de reconocer variantes de Tat de los cinco subtipos principales del VIH-1 (S. Opi et al., *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 35.915-9). En el Documento WO 2006/088740 se describe un anticuerpo monoclonal contra un epítipo lineal de la proteína Tat del VIH-1. Al epítipo se hace referencia como panepítipo.

Existe la necesidad de un anticuerpo monoclonal (mAb) claramente neutralizante contra Tat, con potencial terapéutico.

Sumario de la invención

Es importante la obtención de un mAb claramente neutralizante contra Tat, con potencial terapéutico contra el VIH-1. La invención proporciona dicho mAb, denominado 7G12, que reconoce al menos cinco subtipos del Tat extracelular del VIH-1 (A, B, C, D y E). Este mAb, o un fragmento del mismo, podría ser particularmente útil como una herramienta terapéutica o para determinar la cantidad de proteína Tat en una muestra de un paciente infectado con un VIH-1.

Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal (de clase IgG1) obtenido de la línea de hibridoma depositada el 29 de septiembre de 2011 en el CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris), bajo el número de registro I-4535.

Queda abarcado todo anticuerpo que comprenda el fragmento Fab del anticuerpo 7G12, particularmente los fragmentos que conservan la actividad neutralizante contra el Tat extracelular del VIH-1.

La descripción proporciona además un anticuerpo monoclonal que es sustancialmente idéntico a, preferiblemente que muestra una secuencia de aminoácidos que muestra más de un 80%, preferiblemente más de un 85%, aún preferiblemente más de un 90%, y aún preferiblemente más de un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de, el anticuerpo 7G12.

Lo más preferiblemente, los anticuerpos de la invención presentan una actividad neutralizante contra el Tat extracelular del VIH-1.

Otro sujeto de la invención es la línea de hibridoma depositada el 29 de septiembre de 2011 en el CNCM bajo el número de registro I-4535.

La descripción proporciona además una línea celular que deriva de, o es una progenie de, la anterior línea de

hibridoma y es aún capaz de producir un anticuerpo monoclonal (mAb) neutralizante contra la proteína extracelular transactivador de la transcripción (Tat) del VIH-1.

5 La invención proporciona además un método para detectar o determinar la cantidad de una proteína Tat extracelular en una muestra de un paciente infectado con el VIH, poniendo la muestra en contacto con un anticuerpo de la invención.

Se proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica es particularmente útil como un tratamiento terapéutico contra una infección por el VIH-1, en donde la infección por el VIH-1 puede ser de cualquier subtipo del VIH-1.

10 La invención también proporciona un método para obtener el anticuerpo monoclonal de la Reivindicación 1, método que comprende las operaciones siguientes: a) cultivar y multiplicar el hibridoma I-4535 bajo unas condiciones adecuadas que den lugar a la expresión del anticuerpo 7G12, y b) aislar y purificar dicho anticuerpo del sobrenadante de cultivo producido en la operación (a).

15 Se describe además un método *in vitro* o *in vivo* para la inhibición de la replicación viral del VIH-1 en células de mamífero, método que comprende poner las células en contacto con el anticuerpo como se define en esta memoria.

Leyendas de las figuras

20 La Figura 1 muestra una comparación de secuencias de Tat Oyi y variantes de Tat representativas de los cinco subtipos principales del VIH-1 (en gris, identidades). La secuencia de Oyi C22 se muestra como ID. SEC. nº 1, la secuencia HxB2 se muestra como ID. SEC. nº 2, la secuencia Ug11RP se muestra como ID. SEC. nº 3, la secuencia ELI se muestra como ID. SEC. nº 4, la secuencia CM2 40 se muestra como ID. SEC. nº 5, y la secuencia 96BW se muestra como ID. SEC. nº 6.

25 Las Figuras 2A y 2B son gráficos que muestran que el mAb 7G12 reconoce cruzadamente variantes de Tat heterógonas. Se obtuvieron curvas de afinidad de los mAbs (A) 7G12 y (B) 27A8 frente a diferentes variantes de Tat: Oyi (cuadrado blanco), HxB2 (rombo blanco), UG11RP (triángulo blanco), Eli (cuadrado negro), CM240 (rombo negro) y 96Bw (triángulo negro). B/B0 corresponde a la densidad óptica (OD; del inglés, optical density) medida para cada dilución de Tat, dividida por la OD máxima. La desviación estándar (SD; del inglés, standard deviation) medida es $< 0,02$ ($n = 4$).

30 Las Figuras 3A y 3B son gráficos que muestran que el mAb 7G12 reconoce un epítipo 3D. Se midieron en un ELISA las afinidades (media \pm SD, $n \geq 3$) de los mAbs 7G12 y 27A8 (1/1000) por (A) los péptidos 1 a 5 (p1 a p5) que se solapan con la secuencia de Tat Oyi (barras grises) y (B) Tat Oyi (barras negras) y Tat HxB2 (barras blancas) plegadas o desnaturalizadas o una colección de péptidos (barras grises). En los gráficos de barras, las diferencias estadísticas significativas ($P < 0,01$) entre Tats plegadas y proteínas o péptidos desnaturalizados se indican mediante (*). La Figura 3C es una transferencia Western. El reconocimiento de Tat Oyi por los mAbs 7G12 y 27A8 (1/5000) se llevó a cabo después de un análisis por transferencia Western. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos.

40 Las Figuras 4A a 4D son gráficos que muestran que el mAb 7G12 neutraliza actividades biológicas de Tat Oyi. La proporción de transactivación (media \pm SD, $n \geq 3$) se midió sobre células HeLa P4 con (A) Tat Oyi 0,5 μ M en presencia de diferentes concentraciones del mAb 7G12 (barras negras) y con (B) Tat Oyi 0,5 μ M plegada (f; del inglés, folded) o desnaturalizada (d) o una mezcla de ambas (f + d) en presencia de 50 μ g del mAb 7G12. Se compararon las proliferaciones de células Jurkat (media \pm SD, $n \geq 3$) sin Tat (Testigo, barras de color gris oscuro) con ensayos (C) en presencia de diferentes concentraciones de Tat Oyi o (D) en presencia de Tat Oyi 5 μ M y de diferentes concentraciones del mAb 7G12 (barras negras). En los gráficos de barras, las diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) se indican mediante (*).

45 Las Figuras 5A y 5B son gráficos que muestran que el mAb 7G12 también neutraliza cruzadamente actividades biológicas de otras variantes de Tat. Se compararon (A) las proporciones de transactivación (media \pm SD, $n = 3$) de diversas variantes de Tat (0,5 μ M) en ausencia (barras grises) o presencia del mAb 7G12 (50 μ g, barras negras) o 27A8 (50 μ g, barras blancas) en células HeLa P4. Se compararon (B) las proliferaciones de células Jurkat (media \pm SD, $n = 3$) sin Tat (Testigo, barras de color gris oscuro) con ensayos con diversas variantes de Tat 5 μ M en ausencia (barras grises) o presencia del mAb 7G12 (20 μ g, barras negras) o 27A8 (20 μ g, barras blancas). En los gráficos de barras, las diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) se indican mediante (*).

Descripción detallada de la invención

Los inventores utilizaron la propiedad inmunogénica de la proteína Tat Oyi para obtener un mAb claramente

neutralizante, denominado 7G12, seleccionado por su potente reconocimiento de varias proteínas Tat (Tats) genéticamente heterógonas (Figuras 1 y 2). Mostraron que el mAb 7G12 reconoce un epítipo 3D (Figura 3) y neutraliza la actividad de todas las variantes de Tat examinadas (Figuras 4 y 5). Se observa inhibición de Tat con una relación molar de Tat/mAb 7G12 de 1/1 para la transactivación y 2/1 para la apoptosis.

5 Puesto que las afinidades del anticuerpo y los niveles de neutralización fueron comparables para todas las Tats, los inventores propusieron entonces la hipótesis de que podían adoptar una estructura común, responsable de sus actividades biológicas y reconocida por el mAb. La ausencia de reconocimiento de las variantes de Tat por el mAb en el ensayo ELISA y sobre la transferencia Western después de una degradación mediante urea/calor también confirma que hay un epítipo 3D común en las variantes de Tat.

10 El mAb podría ser empleado en una diversidad de métodos.

En particular, es útil para seleccionar anticuerpos neutralizantes que se unen al mismo epítipo 3D. El anticuerpo también puede ser empleado en un ensayo competitivo para explorar anticuerpos, tales como anticuerpos dirigidos contra Tats plegadas (S. Mediouni et al., *Infect. Disord. Drug Targets*; 11: 57-63) que serían herramientas terapéuticas útiles para seres humanos.

15 El propio mAb 7G12 puede ser empleado en una composición farmacéutica para inmunización pasiva de pacientes infectados por el VIH-1, solo o en combinación con otros mAbs, por ejemplo, anticuerpos anti-gp 120.

Definiciones

20 El término "anticuerpos", como se emplea en esta memoria, se refiere a anticuerpos monoclonales así como a fragmentos y derivados de dichos anticuerpos a menos que se afirme otra cosa o el contexto lo contradiga claramente. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa son típicamente asignados a una de las cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Algunas de éstas son adicionalmente divididas en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas son denominados "alfa", "delta", "épsilon", "gamma" y "mu", respectivamente. Son bien conocidas las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas. IgG y/o IgM son las clases preferidas de anticuerpos empleadas en esta invención porque son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque son muy fácilmente preparadas en un escenario de laboratorio. El anticuerpo 7G12 de la invención es una inmunoglobulina IgG1.

30 En otro aspecto, se pueden preparar fragmentos y derivados funcionales de los anticuerpos descritos en esta memoria, que tengan una unión al antígeno, una especificidad y/o una actividad sustancialmente similares, incluyendo, sin limitación, fragmentos Fab, fragmentos Fab'2, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos "camelizados", janusinas, minicuerpos, CDRs y fragmentos ScFv.

A menos que se especifique otra cosa, los anticuerpos o fragmentos bivalentes o derivados de los mismos son monoespecíficos, es decir, ambos "brazos" de los anticuerpos, fragmentos o derivados se unen al mismo antígeno.

35 En aún otro aspecto, se pueden preparar derivados de anticuerpo que comprendan un anticuerpo de la invención conjugado con, o covalentemente unido a, una toxina, un radioelemento, un grupo detectable (por ejemplo, un flúor) o un soporte sólido.

40 Como se emplean en esta memoria, los términos "aislado" y "purificado" de acuerdo con la invención se refieren a un nivel de pureza que es alcanzable usando la tecnología actual. No es necesario que los anticuerpos de la invención sean absolutamente puros (es decir, no contengan absolutamente moléculas de otras macromoléculas celulares), pero deberían ser suficientemente puros para que quien tiene una experiencia normal en la técnica reconozca que ya no están presentes en el entorno en que se hallaron originalmente (es decir, el medio celular). Por lo tanto, una molécula purificada o aislada de acuerdo con la presente invención es una que ha sido separada de al menos otra macromolécula presente en el entorno natural en que se halló.

45 Más preferiblemente, los anticuerpos de la invención están esencialmente purificados y/o aislados, lo que significa que la composición en que están presentes está casi completamente, o incluso absolutamente, exenta de otras macromoléculas halladas en el entorno en que se encuentran originalmente las moléculas de la invención. De este modo, el aislamiento y la purificación no tienen lugar mediante la adición o eliminación de sales, disolventes o elementos de la tabla periódica, pero deben incluir la eliminación de al menos algunas macromoléculas.

50 "Unión específica" o "especificidad" se refiere a la capacidad de un anticuerpo u otro agente para unirse detectablemente a un epítipo presentado en un antígeno, tal como una Tat, mientras tiene una reactividad relativamente poco detectable con otras proteínas o estructuras. La especificidad puede ser relativamente determinada mediante ensayos de unión o unión competitiva usando, por ejemplo, instrumentos Biacore, como se

describe en otra parte de esta memoria. La especificidad puede ser presentada mediante, por ejemplo, una relación de afinidad/avidez de aproximadamente 10:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1, 10.000:1 o mayor en la unión al antígeno específico frente a la unión inespecífica a otras moléculas irrelevantes (en este caso, el antígeno específico es una Tat).

- 5 "Selectividad" se refiere a la unión preferente de una proteína a una diana particular con respecto a una o más moléculas biológicas, estructuras, células, tejidos, etc. distintos. Por ejemplo, se puede determinar la selectividad mediante ensayos Biacore o ELISA competitivos. La diferencia de afinidad/avidez que indica selectividad puede ser cualquier preferencia detectable (por ejemplo, sería adecuada una relación superior a 1:1,1, o superior a aproximadamente 1:5, si fuera detectable, incluyendo 1:10, 1:100, 1:1000 o más). A menos que se especifique otra cosa, cualquier dato cuantitativo sobre "afinidad" presentado en esta memoria se refiere a mediciones de unión bivalente (en vez de monovalente).

10 Un "epítipo" o "sitio de unión" es una zona o región de un antígeno a la cual se une específicamente un péptido ligante de antígeno (tal como un anticuerpo). Un epítipo proteico puede comprender restos de aminoácido directamente implicados en la unión (también llamados componentes inmunodominantes del epítipo) y otros restos de aminoácido que no están directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácido que son eficazmente bloqueados por el péptido que se une específicamente al antígeno (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la "huella" del péptido que se une específicamente al antígeno). En esta memoria, el término "epítipo" incluye ambos tipos de sitios ligantes de aminoácidos de cualquier región particular de una Tat que se une específicamente a un anticuerpo anti-Tat. Las Tats pueden comprender un número de epítipos diferentes que pueden incluir, sin limitación, (1) determinantes antigénicos peptídicos lineales, (2) determinantes antigénicos conformacionales que consisten en uno o más aminoácidos no contiguos situados cerca uno de otro en una conformación de Tat madura, y (3) determinantes antigénicos postraduccionales que consisten, en su totalidad o en parte, en estructuras moleculares covalentemente fijadas a una Tat, tales como grupos carbohidrato.

15 La expresión "se une a sustancialmente el mismo epítipo que" el anticuerpo monoclonal 7G12 significa que un anticuerpo "compite" con el anticuerpo 7G12, generalmente por unirse a Tat del VIH-1. Quedan abarcadas formas humanas, quiméricas y humanizadas del anticuerpo 7G12. La expresión "sustancialmente idénticas" en el contexto de dos secuencias de aminoácidos significa que las secuencias, cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante el programa GAP o BESTFIT usando los pesos de hueco por omisión, comparten al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, al menos aproximadamente 95, al menos aproximadamente 98 o al menos aproximadamente 99 por ciento de identidad secuencial. En una realización, las posiciones de restos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas. La identidad secuencial se mide típicamente usando un software para análisis de secuencias. El software para análisis de proteínas hace coincidir secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, supresiones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el software GCG públicamente disponible contiene programas tales como "Gap" y "BestFit" que pueden ser empleados con los parámetros por omisión para determinar la homología secuencial o la identidad secuencial entre polipéptidos íntimamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una proteína mutada de la misma. Véase, por ejemplo, GCG versión 6.1. También se pueden comparar secuencias polipeptídicas usando FASTA, aplicando los parámetros por omisión o recomendados. Un programa de GCG versión 20 6.1, FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3), proporciona alineamientos y porcentaje de identidad secuencial de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias en cuestión y las secuencias de búsqueda (Pearson, Methods Enzymol. 1990, 183: 63-98; Pearson, Methods Mol. Biol. 2000, 132: 185-219). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diversos organismos es el programa informático BLAST, especialmente Blastp, usando los parámetros por omisión. Véanse, por ejemplo, Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403-410; y Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3389-402 (1997). Las posiciones de aminoácido "correspondientes" en dos secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas son las alineadas por cualquiera de los softwares para análisis de proteínas mencionados en esta memoria, usando los parámetros por omisión.

50 Producción de anticuerpo

El anticuerpo monoclonal de la invención puede ser obtenido del hibridoma depositado como I-4535 en el CNCM. O puede ser recombinantemente producido mediante cualquier método conocido por quien tiene experiencia en la técnica, por ejemplo, por recombinación en una célula huésped transformada con uno o más vectores que permiten la expresión y/o secreción de las secuencias nucleotídicas que codifican la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo. El vector contiene generalmente un promotor, señales de iniciación y terminación de la traducción, y adecuadas regiones reguladoras de la transcripción. Se mantiene establemente en la célula huésped y puede poseer opcionalmente señales específicas para la secreción de la proteína traducida. Estos diferentes componentes son seleccionados y optimizados por quien tiene experiencia en la técnica de acuerdo con la célula huésped empleada.

compuestos luminiscentes, etcétera) como al etiquetado indirecto (por ejemplo, por medio de anticuerpos que están ellos mismos directamente etiquetados o usando reactivos que consisten en una "pareja de afinidad" etiquetada, tal como, aunque no exclusivamente, la pareja biotina-avidina etiquetada, etcétera).

5 Por lo tanto, en particular, la invención proporciona un método para detectar *in vitro* una infección por el VIH en una muestra biológica, método que comprende a) poner la muestra biológica en contacto con un anticuerpo de la invención; b) incubar la mezcla bajo unas condiciones que permitan la formación de complejos de antígeno-anticuerpo; y c) revelar los complejos de antígeno-anticuerpo formados, operación en la que se emplea opcionalmente un anticuerpo de detección etiquetado capaz de unirse a la proteína Tat.

10 Este inmunoensayo puede ser llevado a cabo de acuerdo con diversos formatos bien conocidos por los expertos en la técnica: en fase sólida o en fase homogénea; en una operación o en dos operaciones; en un método de doble sándwich (sándwich para las dos detecciones de antígeno y anticuerpo); o en un método indirecto (para la detección del anticuerpo) combinado con un método de sándwich (para la detección del antígeno), a modo de ejemplos no restrictivos.

15 De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo de captura es inmovilizado sobre una fase sólida. A modo de ejemplos no restrictivos de fase sólida, se pueden utilizar microplacas, en particular microplacas de poliestireno, tales como las comercializadas por la compañía Nunc, Dinamarca. También se pueden utilizar partículas o glóbulos sólidos; glóbulos paramagnéticos, tales como los proporcionados por Dynal o Merck-Eurolab (Francia); o, si no, tubos de ensayo hechos de poliestireno o polipropileno, etcétera.

20 Un formato de inmunoensayo del tipo sándwich entre dos anticuerpos (anticuerpos de captura y de detección) es particularmente ventajoso para detectar los antígenos presentes en la muestra biológica, mientras que los anticuerpos pueden ser revelados utilizando un antígeno de captura y un producto de conjugación etiquetado que se fija al anticuerpo (de acuerdo con un formato al que comúnmente se hace referencia como "formato indirecto"), por ejemplo, proteína A etiquetada o un anticuerpo anti-inmunoglobulina o anti-isotipo etiquetado. También es posible un formato de inmunoensayo para detectar los antígenos por competición. También se pueden idear otros modos de
25 inmunoensayo, los cuales son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Se pueden emplear ensayos ELISA, radioinmunoensayos o cualquier otra técnica de detección para revelar la presencia de los complejos de antígeno-anticuerpo formados.

30 La detección de la presencia de antígenos en la muestra biológica puede ser completada por cuantificación, por ejemplo, midiendo las señales emitidas por las etiquetas (color, luminiscencia, radiactividad, etc.) de acuerdo con las técnicas estándares conocidas por los expertos en este campo técnico.

Los anticuerpos de la invención pueden ser parte de un kit para detectar proteína Tat extracelular en una muestra, en donde el kit puede comprender además medios de detección para revelar el complejo de antígeno-anticuerpo.

Exploración y selección de anticuerpos

35 Los anticuerpos de esta invención son anticuerpos "neutralizantes", "bloqueantes" o "inhibitorios" en el sentido de que reducen, neutralizan y/o bloquean, al menos parcialmente y detectablemente, las funciones de Tat, como actividades de transactivación y/o apoptosis, y/o la replicación del VIH. Esta actividad puede ser examinada, por ejemplo, como se muestra en la Sección Experimental.

40 La identificación de uno o más anticuerpos que se unen a sustancial o esencialmente el mismo epítipo que los anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria puede ser fácilmente determinada empleando cualquiera de una diversidad de ensayos de exploración inmunológica en los que se puede evaluar la competición de anticuerpos. Una diversidad de dichos ensayos es rutinariamente llevada a la práctica y es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 5.660.827). Se entenderá que, para identificar un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal descrito en esta memoria, no es necesario en modo alguno determinar realmente el epítipo al que se une un anticuerpo descrito en esta memoria.

45 Por ejemplo, cuando los anticuerpos de ensayo que se van a examinar se obtienen de diferentes fuentes animales, o incluso son de un diferente isotipo de Ig, se puede emplear un ensayo de competición simple en el que se mezcla el anticuerpo testigo con el anticuerpo de ensayo y luego se aplica la mezcla a una muestra. Los protocolos basados en ensayos ELISA, radioinmunoensayos y transferencia Western y el uso del análisis BIACORE son adecuados para uso en dichos estudios de competición simple.

50 Preferiblemente, los anticuerpos de la invención muestran sustancialmente la misma afinidad por cualquier proteína Tat que el anticuerpo 7G2. En particular, los anticuerpos son preferiblemente seleccionados cuando muestran una afinidad con un valor de K_D de aproximadamente 2 a 20 nM.

Formulaciones

Por lo tanto, otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo como ingrediente activo, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 En la presente descripción, se debe entender que "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica y no causan reacciones secundarias y que, por ejemplo, facilitan la administración del (de los) ingrediente(s) activo(s), aumentan la semivida y/o la eficacia de los mismos en el cuerpo, aumentan la solubilidad de los mismos en disolución o, si no, mejoran el almacenamiento de los mismos.

10 Estos excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y serán adaptados por quien tiene experiencia en la técnica de acuerdo con la naturaleza y el método de administración escogidos.

Son excipientes adecuados, por ejemplo, el agua, la disolución salina, la dextrosa, el glicerol, el etanol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsivos o agentes reguladores del pH.

15 De este modo, el anticuerpo puede ser obtenido en forma purificada, es decir, en una forma que presenta un grado de pureza de al menos 80%, 85%, 90%, 95% o más. El grado de pureza se define con respecto a las demás proteínas presentes en la mezcla, que se considera que son contaminantes. Este grado se evalúa por colorimetría de un SDS-PAGE usando azul de Coomassie. La medición densitométrica de las bandas hace posible cuantificar el grado de pureza. El grado de pureza puede ser también medido por HPLC en fase inversa, midiendo el área de los diferentes picos.

20 Preferiblemente, la formulación se almacena en forma líquida o en forma liofilizada.

Se pueden emplear compuestos reguladores del pH, por ejemplo, en forma de carbonato, fosfato, citrato, acetato, borato, trimetamina [(2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol), TRIS], glicocola y lisina [PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, volumen 51 (4), 1997: "Excipients and their use in injectable products" (SANDEEP NEMA, R. J. WASHKUHNS y R. J. BRENDEL, páginas 166-171)].

25 También es ventajosa la adición de un agente tensioactivo del tipo polímero no iónico, tal como polisorbato 80 (Tween® 80), o un poloxámero del tipo poloxámero 188 (Pluronic F68® o Lutrol F68®).

En un modo preferido, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 g/l de anticuerpo, preferiblemente alrededor de 0,3 g/l de anticuerpo.

30 Preferiblemente, el anticuerpo se administra por la vía sistémica, en particular por la vía intravenosa, la vía intramuscular, la vía intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, o por la vía oral. Más preferiblemente, la composición que comprende los anticuerpos de la invención se proporciona en varias administraciones distribuidas a lo largo del tiempo.

35 Los anticuerpos pueden ser convencionalmente administrados parenteralmente, por inyección, por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en ciertos casos, formulaciones orales.

40 Los supositorios pueden incluir agentes aglutinantes y vehículos tradicionales, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dicho supositorios pueden ser formados a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en una cantidad en el intervalo de 0,5% a 10%, preferiblemente 1-2%. Las formulaciones orales incluyen dichos excipientes normalmente empleados, tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones tienen la forma de disoluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación ininterrumpida o polvos y contienen 10-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25-70%.

En muchos casos será deseable tener administraciones múltiples del anticuerpo.

45 En general, cada dosis puede comprender entre aproximadamente 5 µg y aproximadamente 1 mg del anticuerpo, preferiblemente entre 10 y 200 µg. Quien tiene experiencia en la técnica puede también considerar otros intervalos de dosis.

Indicaciones terapéuticas

La presente invención también pretende cubrir las composiciones farmacéuticas para uso como un producto medicinal, en particular para uso en el tratamiento de una infección por el VIH.

Los anticuerpos de la invención son anticuerpos neutralizantes con respecto a cualquier subtipo del VIH-1, en particular con respecto a 2, 3, 4 o más subtipos del VIH-1.

En particular, inhiben la actividad inducida de transactivación y apoptosis de Tat Oyi.

5 En una realización preferida, los anticuerpos de la invención inhiben la transactivación de Tat de dos, tres, cuatro, cinco o más subtipos del VIH-1 seleccionados de entre Oyi, A, B, C, D, E, F, G, H, J y K.

Lo más preferiblemente, los anticuerpos de la invención inhiben la transactivación de Tat de cinco subtipos del VIH-1 (además de Oyi), preferiblemente A, B, C, D y E.

De este modo, la presente invención proporciona un método para tratar una infección por VIH en un paciente, método que comprende administrar un anticuerpo de la invención al paciente.

10 Los anticuerpos descritos en esta memoria son candidatos valiosos para desarrollar un tratamiento para un gran número de, o incluso todos, los individuos infectados por el VIH.

15 Los anticuerpos pueden ser utilizados en una composición farmacéutica para la inmunización pasiva de pacientes infectados por el VIH, solos o en combinación con otros mAbs, por ejemplo, anticuerpos anti-gp120. Los anticuerpos de la invención son ventajosamente combinados con una terapia antirretroviral en la que se usan inhibidores de la polimerasa del VIH y/o de la integrasa del VIH.

Se reconoce un efecto terapéutico si los pacientes seropositivos que no reciben tratamiento antiviral presentan una menor viremia y un aumento de linfocitos CD4. Por ejemplo, se reconoce un efecto terapéutico cuando el 30% de una cohorte de al menos 55 pacientes seropositivos para el VIH mantiene su viremia por debajo de 50 copias/ml después de la interrupción de su tratamiento HAART durante dos meses.

20 En pacientes con sida declarado, dicho tratamiento anti-Tat podría limitar la incidencia de ciertos estados patológicos tales como el sarcoma de Kaposi o de síndromes neurológicos que parecen estar vinculados a una acción directa de la proteína Tat después de su secreción por células infectadas por el VIH.

25 En pacientes asintomáticos, se espera que la composición farmacéutica de la invención retrase el progreso hacia el sida a causa de una menor viremia y un aumento de linfocitos CD4. Dicho tratamiento permitiría que el paciente restableciera una respuesta celular inmune eficaz contra células infectadas por el VIH, como no parece ser el caso al inicio de la infección; en particular, el restablecimiento de la actividad de los linfocitos T citotóxicos (CTL; del inglés, *cytotoxic T lymphocytes*), las células NK y los macrófagos, cuya actividad es inhibida por Tat. El tratamiento tendría la consecuencia de permitir que los pacientes al menos llegaran a ser no progresivos.

Las figuras y los ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

30 Ejemplos

Métodos

Variantes de Tat y síntesis de péptidos

35 Se ensambló Tat Oyi mediante una síntesis en fase sólida de un modo previamente descrito (Péloponèse et al., J. Biol. Chem. 1999, 274: 11.473-8). Una sustitución Ser→Cys en la posición 22 de la secuencia de Tat Oyi (Figura 1) permitió recuperar la actividad biológica de Tat Oyi y su uso en ensayos de neutralización con anticuerpos. También se sintetizaron cinco péptidos que cubrían la secuencia completa con solapamientos (1-22, 13-46, 38-72, 57-86 y 72-101), denominados respectivamente péptidos 1 a 5. Otras Tats sintetizadas corresponden al clado A, predominante en Uganda (Ug11RP), el clado D, predominante en la República Democrática del Congo (Eli), el clado recombinante CRF_AE, predominante en Tailandia (CM240), el clado C, predominante en Sudáfrica (96Bw), y el clado B, predominante en Europa y las Américas (HxB2) (Figura 1). Se llevaron a cabo la purificación y el análisis de un modo previamente descrito (J. D. Watkins et al., *Retrovirology* 2006, 3: 8-17). Después de una liofilización se comprobó la actividad biológica de las variantes de Tat mediante ensayos de transactivación con células HeLa P4 de un modo previamente descrito (S. Opi et al., J. Biol. Chem. 2002, 277: 35.915-9).

Inmunización y producción de anticuerpos monoclonales

45 Se inmunizaron cuatro ratones BALB/c con 10 µg de Tat Oyi sintética en 100 µl de adyuvante de fosfato cálcico (Brenntag Biosector, Dinamarca) por la vía subcutánea. Dos semanas más tarde, los ratones recibieron un refuerzo con la misma preparación. Cinco semanas más tarde, los ratones recibieron de nuevo un refuerzo con la misma preparación por la vía intramuscular. También se inmunizaron tres ratones testigo con los mismos adyuvante y protocolo pero sin proteína Tat. El día 45, los ratones fueron sacrificados y terminalmente sangrados. Los 50 esplenocitos fueron inmediatamente separados para hibridarlos con células de mieloma de un modo descrito (S. A.

5 Fuller et al., John Wiley and Sons (redactor), New York, 1991, páginas 11.01-11.11.5). Los sobrenadantes del hibridoma aislado fueron explorados mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA; del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay) frente a Tat Oyi para identificar los clones productores. A continuación, se subclonaron estos dos veces mediante diluciones limitantes (< 1,0 célula por pocillo) y se exploraron los clones positivos para el anticuerpo mediante un ELISA primero frente a Tat Oyi y luego frente a las Tats Ug11RP, ELI, CM240, 96BW y HxB2.

Previamente se había llevado a cabo una inmunización similar de cuatro ratas con Tat Oyi y se había seleccionado un mAb (IgG1), denominado 27A8, por su potente reconocimiento de Tat Oyi, anticuerpo que fue utilizado como testigo.

10 Se cultivaron los hibridomas seleccionados y se purificaron los mAbs (IgG1) mediante cromatografía sobre proteína G (Roche Diagnostics, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Después de la purificación, los anticuerpos fueron sometidos a diálisis frente a tampón de Hepes 20 mM, NaCl 120 mM, pH de 7,3, y fueron concentrados hasta 1 mg/ml.

Detección por ELISA de respuestas de mAbs purificados

15 Las placas de 96 pocillos fueron revestidas con 100 ng de Tats plegadas o desnaturalizadas o los péptidos 1 a 5 (1 µg/ml en tampón de fosfato 100 mM, pH de 4,5) o la colección de péptidos (cada péptido: 1 µg/ml en tampón de fosfato 100 mM, pH de 4,5). Las Tats (10 µg/ml) fueron desnaturalizadas mediante calentamiento a 90 °C durante 20 minutos en presencia de urea 3 M y fueron luego diluidas 1:10 con tampón frío de fosfato 100 mM, pH de 4,5. Para controlar el efecto de la urea, las Tats plegadas pudieron ser también usadas para revestimiento en presencia de urea 0,3 M. Después del bloqueo con leche desnatada al 5% y de las operaciones de lavado, las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37 °C con 100 µl de mAb purificado y diluido. Después de las operaciones de lavado, se añadieron 100 µl de IgG anti-ratón o anti-rata, conjugada con HRP (Amersham, EE.UU.), y se dejaron las placas en incubación durante 1 hora a 37 °C. Después de las operaciones de lavado, se añadieron 100 µl de sustrato ABTS (Roche Diagnostics, Alemania). En 1 hora se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm.

25 Medición de las constantes de velocidad de asociación del mAb 7G12 con Tats en disolución

Se empleó un método basado en ELISA para medir, en disolución, las constantes de velocidad de asociación de antígeno/anticuerpo (F. Hardy et al., J. Immunol. Methods 1997, 200: 155-9). En resumen, se revistieron placas de 96 pocillos con 100 ng de Tat Oyi en tampón de fosfato 100 mM, pH de 4,5, durante la noche a 4 °C. Un pocillo de cuatro fue dejado sin revestir. Después de las operaciones de lavado, las placas fueron bloqueadas con leche desnatada al 5% en PBS durante 1 hora. El anticuerpo (1 µg/ml) y las disoluciones de variantes de Tat (0 a 0,4 µg/ml) se prepararon en tampón de Hepes 20 mM, NaCl 120 mM, pH de 7,3, al doble de la concentración final. A tiempo cero, se mezclaron volúmenes similares de disoluciones de anticuerpo y antígeno e inmediatamente (tiempo cero del análisis cinético) se transfirieron 100 µl a tres pocillos revestidos y un pocillo sin revestir. Cada cinco minutos, los pocillos fueron llenados con una muestra de mezcla de mAb/Tat. Cada muestra fue incubada en los pocillos durante 4,5 minutos y fue separada. Al final del análisis cinético, las placas fueron lavadas y fueron incubadas con IgG anti-ratón conjugada con HRP. Después de las operaciones de lavado se añadieron 100 µl de sustrato ABTS. En 1 hora se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm. Luego se determinaron las constantes de las velocidades de asociación y disociación (k_{on} y k_{off}), lo que permitió el cálculo de la constante de disociación en equilibrio (KD).

40 Transferencia Western

Se sometieron proteínas Tat (100 ng) a SDS-PAGE (15%) bajo condiciones reductoras (urea 6 M en tampón para muestras de Laemmli a 96 °C durante 10 minutos). Luego se electrotransfirieron las Tats a membranas de nitrocelulosa. Después del bloqueo con leche desnatada al 5%, las tiras de la membrana fueron incubadas durante 1 hora con mAbs 7G12 o 27A8 en 1:2500. El anticuerpo secundario era IgG anti-ratón o anti-rata, conjugada con HRP y diluida 1/1000, y las bandas se revelaron con H₂O₂ al 0,1% y tetrahidrocloruro de diaminobencidina (Sigma, EE.UU.) como sustrato.

Neutralización de la transactivación de Tat

50 Las neutralizaciones de la transactivación de Tat se llevaron a cabo con células HeLa transfectadas con LTR de VIH y se analizaron determinando la producción de β-galactosidasa (β-Gal) en células HeLa-P4 de un modo previamente descrito (Peloponese et al., J. Biol. Chem. 1999, 274: 11.473-8).

Se diluyeron Tats liofilizadas o desnaturalizadas hasta 5 µM (o 10 µM) en tampón de fosfato 100 mM, pH de 4,5. Antes de la adición a las células, se diluyó la Tat hasta 0,5 µM con 400 µl de medio DMEM con albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich) al 0,1% y protamina A (Sigma, EE.UU.) al 0,01% y

las descritas concentraciones de anticuerpos. Se ajustaron los volúmenes con tampón de Hepes 20 mM, NaCl 120 mM, pH de 7,3. Cuando se añadían conjuntamente, las Tats desnaturalizada y plegada tenían una concentración final de 0,5 μ M cada una.

5 Después de 18 horas a 37 °C se midió la producción de β -Gal con un kit de ELISA para β -Gal (Roche Diagnostics, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La proporción de transactivación era la cantidad de β -Gal en presencia de Tat dividida por la cantidad sin Tat.

Ensayo del metil-tiazolil-tetrazolio (MTT) con células T Jurkat

10 Se cultivaron células T Jurkat en medio RPMI 1640 con glutamina complementado con suero de ternera fetal al 10% (volumen/volumen) térmicamente inactivado, 100 μ g/ml de estreptomycin y 100 unidades/ml de penicilina. Se transfirieron 10^5 células en 100 μ l de medio RPMI con BSA al 0,1% y protamina A al 0,01% a los pocillos de placas de 96 pocillos. Se diluyeron las Tats liofilizadas hasta 55 μ M (o 65 μ M) en tampón de fosfato 100 mM, pH de 4,5. Se incubaron las células 48 horas a 37 °C con las cantidades indicadas de Tats y mAbs. Los pocillos testigos se ajustaron con 10 μ l de tampón de fosfato 100 mM, pH de 4,5, y 20 μ l de tampón de Hepes 20 mM, NaCl 120 mM, pH de 7,3. Se añadieron 0,5 mg de MTT (InterChim, Francia) y se incubó la mezcla 5 horas. Se disolvieron los cristales de formazán en 200 μ l de dimetilsulfóxido y se midió la absorbancia a 510 nm.

Análisis estadístico

Se analizaron las diferencias estadísticas mediante el uso de la prueba de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$.

Resultados

20 El mAb 7G12 reconoce cruzadamente variantes de Tat de los cinco subtipos principales del VIH-1

Se inmunizaron ratones con Tat Oyi y se seleccionó un mAb, denominado 7G12, entre 132 clones previamente explorados por su respuesta inmune claramente reactiva frente a un conjunto de variantes de Tat representativas de diferentes clados del VIH-1 (Figura 1). Para caracterizar el reconocimiento cruzado, se evaluaron las afinidades del mAb 7G12 por las diferentes variantes de Tat en un ensayo ELISA (Figura 2A). El mAb 7G12 se unió a todas las Tats con una afinidad similar. Un mAb testigo denominado 27A8 sólo se unió con elevada afinidad a las Tats Oyi y HxB2, pero no a las otras (Figura 2B). Con objeto de cuantificar las afinidades del mAb 7G12 por las variantes de Tat, se empleó un método basado en ELISA (F. Hardy et al., J. Immunol. Methods 1997, 200: 155-9) para medir las constantes de velocidad de asociación de antígeno/anticuerpo en disolución. Se mezclaron el antígeno y el anticuerpo y, a diferentes intervalos de tiempo, se extrajeron partes alícuotas para determinar por ELISA la cantidad de anticuerpo libre. La desaparición de anticuerpo libre reflejaba el curso temporal de la reacción de asociación. La constante de afinidad obtenida para Tat Oyi fue elevada ($KD = 7 \pm 0,4$ nM). Las KD para las Tats UG11RP, Eli, CM240 y 96BW fueron muy similares ($12 \pm 0,5$, $5,7 \pm 0,1$, $3,2 \pm 0,1$ y $7,4 \pm 0,3$ nM, respectivamente). Estos resultados confirmaban las curvas de afinidad por ELISA (Figura 2A) y sugerían que el mAb 7G12 reconocía un epítipo común en todas las variantes de Tat examinadas. Es interesante que la comparación de secuencias sólo muestre un pequeño porcentaje de posibles epítopos continuos (> 5 aminoácidos) entre las diferentes Tats (Figura 1).

El mAb 7G12 reconoce un epítipo 3D

40 Para mapear los epítopos reconocidos por los mAbs 7G12 y 27A8, se llevó a cabo un ensayo ELISA de un modo previamente descrito (S. Mediouni et al., Infect. Disord. Drug Targets; 11: 57-63) usando 100 ng de diferentes péptidos solapantes que abarcan la secuencia completa de Tat Oyi (Figura 3A). El mAb 7G12 no reconoció péptidos, mientras que el mAb 27A8 reconoció el péptido 5 que cubre la secuencia C-terminal (72 a 100). De este modo, el mAb 27A8 reconocía un epítipo lineal en el dominio C-terminal, sólo conservado entre las Tats Oyi y HxB2 (83,3% de identidad) pero no en otras variantes de Tat. Estos datos sugerían que el mAb 7G12 no reconocía un epítipo lineal sino un epítipo 3D en la superficie de Tat Oyi que corresponde a una plegadura particular muy conservada en las variantes de Tat.

50 Para probar esta hipótesis, se llevaron a cabo ensayos ELISA con los mAbs 7G12 y 27A8 frente a las Tats Oyi y HxB2 plegadas o desnaturalizadas (Figura 3B). La urea empleada para completar la desnaturalización no modificó las respuestas de ambos mAbs en el ELISA. El mAb 7G12 no reconocía variantes de Tat después de la desnaturalización ni una colección de péptidos, lo que resalta que este anticuerpo se dirigía contra un epítipo 3D y no contra un epítipo lineal. Por contraste, el mAb 27A8 reconocía variantes de Tat desnaturalizadas y la colección de péptidos, lo que confirmaba que se dirigía contra un epítipo lineal. Además, el mAb 7G12 también era incapaz de reconocer a Tat Oyi en un análisis por transferencia Western (Figura 3C). Por contraste, el mAb 27A8 reconocía acusadamente a Tat Oyi a la misma dilución.

El mAb 7G12 neutraliza la transactivación de Tat Oyi

5 Se determinó el efecto neutralizante del mAb 7G12 sobre la actividad de transactivación de Tat Oyi 0,5 μ M con células HeLa transfectadas con LTR (Figura 4A). 50 μ g del mAb 7G12 neutralizaban casi completamente la actividad de transactivación de Tat Oyi. La potencia de neutralización del mAb 7G12 se correlacionaba con la concentración de anticuerpo. En nuestros ensayos, la máxima neutralización se alcanzó con 0,33 nanomoles de mAb frente a 0,25 nanomoles de Tat, lo que sugiere una asociación molar-molar.

10 Para precisar si el efecto neutralizante del mAb 7G12 se debía al reconocimiento de un epítipo 3D, se examinó la actividad de transactivación usando las Tats Oyi 0,5 μ M plegada y desnaturalizada (Figura 4B). La Tat Oyi desnaturalizada había perdido la actividad de transactivación pero no evitaba el efecto biológico de la Tat plegada cuando ambas se añadían juntas. Resulta interesante que la Tat no plegada no disminuía el efecto neutralizante de 50 μ g de mAb 7G12 cuando las Tat plegada y desnaturalizada estaban en competición. Estos datos mostraban que la actividad de Tat Oyi en disolución dependía de la conformación y era bloqueada por el mAb 7G12 que reconocía un epítipo 3D.

El mAb 7G12 inhibe la apoptosis inducida por Tat Oyi en linfocitos

15 La Tat también puede atravesar membranas y desencadenar apoptosis mitocondrial (J. De Mareuil et al., *Retrovirology* 2005, 2: 5-15). Se determinó la viabilidad de linfocitos Jurkat en presencia de Tat Oyi usando un ensayo colorimétrico basado en sales de tetrazolio (Figura 4C). Tat Oyi 10 μ M inhibía casi completamente la proliferación de células Jurkat. Esta inhibición se correlacionaba con la concentración de Tat Oyi hasta 1 μ M.

20 Se evaluó el efecto neutralizante del mAb 7G12 sobre la inhibición, inducida por Tat Oyi, de la proliferación (Figura 4D). 20 μ g de mAb 7G12 invertían completamente la inhibición de Tat Oyi 5 μ M, y se observó neutralización hasta 5 μ g de mAb 7G12.

El mAb 7G12 también neutraliza cruzadamente actividades biológicas de otras variantes de Tat

25 Se evaluó la actividad neutralizante cruzada de 50 μ g de mAb 7G12 usando el ensayo de transactivación con células HeLa P4 y diversos subtipos del VIH-1 en concentración 0,5 μ M, incluyendo A, B, C, D y la forma recombinante A_E. Se comparó el mAb 7G12 con el mAb 27A8 (Figura 5A). El mAb 7G12 inhibía la actividad de transactivación de todas las variantes de Tat examinadas tan acusadamente como con Tat Oyi, su diana inmunogénica. De hecho, el mAb 7G12 inhibía el 61,9%, 66,3%, 57,1%, 53,2% y 50,8% de las actividades de transactivación de las variantes UG11RP, HxB2, 96Bw, Eli y CM240, respectivamente, en comparación con el 63,7% observado con Tat Oyi. Por contraste, el mAb 27A8 sólo mostraba un pequeño efecto inhibitorio sobre Tat Oyi y Tat HxB2 (12% y 19,4%, respectivamente) y ninguna inhibición significativa sobre otras Tats.

30 También se examinaron los efectos neutralizantes de los mAbs 7G12 y 27A8 sobre la inhibición, inducida por variantes de Tat en concentración 5 μ M, de la proliferación (Figura 5B). El mAb 7G12, pero no el mAb 27A8, invertía completamente la inhibición, inducida por las diferentes Tats, de la proliferación. Por lo tanto, el mAb 7G12 neutralizaba las actividades biológicas de las diferentes variantes de Tat examinadas con una eficacia similar, lo que sugiere que la plegadura conformacional reconocida por el anticuerpo se conservaba en estas variantes y estaba relacionada con la actividad de Tat.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Université de la Méditerranée

5 <120> Un anticuerpo monoclonal anti-Tat del VIH-1

<130> B1240

<160> 6

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 100

15 <212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 1

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Ala Arg Cys Cys
 20 25 30

Leu His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr
 35 40 45

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Pro Gln Asn Ser Lys
 50 55 60

Thr His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly
 65 70 75 80

Asp Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr
 85 90 95

Asp Pro Glu Asp
 100

20 <210> 2

<211> 100

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

25 <400> 2

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

ES 2 553 597 T3

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln Asn Ser Ser Thr
50 55 60

His Gln Ala Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Pro Arg Gly Asp
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu Thr
85 90 95

Asp Pro Glu Asp
100

- <210> 3
- 5 <211> 101
- <212> PRT
- <213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 3
Met Asp Pro Val Asp Pro Asn Ile Glu Pro Trp Asn His Pro Gly Ser
1 5 10 15

Gln Pro Thr Thr Pro Cys Asn Lys Cys Tyr Cys Lys Val Cys Cys Tyr
20 25 30

His Cys Leu Val Cys Phe Gln Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Lys Gln Arg Arg Gly Pro Thr Gln Ser Asn Lys Gln
50 55 60

Thr His Asn Pro Ile Pro Lys Gln Pro Ile Pro Arg Thr Gln Gly Ile
65 70 75 80

Ser Thr Gly Pro Glu Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Asp Lys Thr Glu
85 90 95

10 Thr Asp Arg Arg Asp
100

- <210> 4
- <211> 99
- <212> PRT
- 15 <213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 4
Met Asp Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn His Pro Gly Cys
1 5 10 15

Gln Pro Arg Thr Pro Cys Asn Lys Cys His Cys Lys Lys Cys Cys Tyr
20 25 30

ES 2 553 597 T3

His Cys Pro Val Cys Phe Leu Asn Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Gly Pro Pro Gln Gly Gly Gln Ala
 50 55 60

Thr His Gln Pro Ile Pro Lys Gln Pro Ser Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Gln Glu Gln Lys Lys Lys Val Glu Ser Thr Ala Thr
 85 90 95

Asp Pro Glu

- 5 <210> 5
- <211> 101
- <212> PRT
- <213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 5
 Met Glu Leu Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Thr Thr Ala Cys Ser Lys Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Trp
 20 25 30

His Cys Gln Leu Cys Phe Leu Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg His Arg Arg Gly Thr Pro Gln Ser Ser Lys Asp
 50 55 60

Thr His Asn Pro Ile Pro Lys Gln Pro Leu Pro Ile Ile Arg Arg Asn
 65 70 75 80

Pro Thr Asp Pro Lys Glu Ser Lys Lys Glu Val Ala Ser Lys Ala Glu
 85 90 95

10 Thr Asp Gln Cys Asp
 100

- <210> 6
- <211> 102
- <212> PRT
- 15 <213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 6
 Met Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser

ES 2 553 597 T3

1 5 10 15

Gln Pro Asp Thr Ala Cys Thr Lys Cys Tyr Cys Lys Tyr Cys Cys Tyr
 20 25 30

His Cys Asn Leu Leu Val Cys Phe Gln Thr Lys Gly Leu Gly Ile Ser
 35 40 45

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Ser Thr Pro Pro Ser Ser
 50 55 60

Glu Ser His Gln Asn Leu Ile Ser Ser Glu Gln Pro Leu Pro Arg Thr
65 70 75 80

Gln Gly Asn Pro Thr Gly Ser Glu Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Ser
 85 90 95

Lys Thr Glu Ala Asp Pro
 100

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que es obtenido u obtenible de la línea de hibridoma depositada el 29 de septiembre de 2011 en el CNCM bajo el número de registro I-4535.
2. Un fragmento de anticuerpo monoclonal, que comprende el fragmento Fab del anticuerpo de la Reivindicación 1.
- 5 3. Un anticuerpo monoclonal que comprende el fragmento Fab del anticuerpo de la Reivindicación 1.
4. El anticuerpo monoclonal de la Reivindicación 3, que presenta una actividad neutralizante contra Tat extracelular del VIH-1.
5. Una línea de hibridoma depositada el 29 de septiembre de 2011 en el CNCM bajo el número de registro I-4535.
- 10 6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. La composición farmacéutica de la Reivindicación 6, para uso en el tratamiento de una infección por el VIH-1.
8. La composición farmacéutica para uso de la Reivindicación 7, en donde la infección por el VIH-1 es de cualquier subtipo del VIH-1.
- 15 9. Un método para obtener el anticuerpo monoclonal de la Reivindicación 1, método que comprende las operaciones siguientes: a) cultivar y multiplicar el hibridoma I-4535, depositado en el CNCM el 29 de septiembre de 2011, bajo unas condiciones adecuadas que den lugar a la expresión del mAb 7G12; y b) aislar y purificar el mAb 7G12 del sobrenadante de cultivo producido en la operación (a).
- 20 10. Un método *in vitro* para la inhibición de la replicación vírica del VIH-1 en células de mamífero, método que comprende poner las células en contacto con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4.
11. Un método *in vitro* para detectar o determinar la cantidad de una proteína Tat extracelular en una muestra de un paciente infectado por el VIH-1, poniendo la muestra en contacto con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4.

1-----10-----20-----30-----40-----50-----
 OyiC22 ME PVD PRLE P WKHPG SQPKT ACNHCYCKARCCCLHCQVCFTRKGLGISYGRKKRRQRRRA
 HxB2 ME PVD PRLE P WKHPG SQPKT ACTHCYCK-KCCFHCQVCFITKALGISYGRKKRRQRRRA
 Ug1LRP MD PVD PNI EP WNHFG SQPTT PCNHCYCK-VCCYHCLVCFQSKGLGISYGRKKRKQRRGP
 ELI MD PVD PNI EP WNHFG SQPRT PCNHCCK-KCCYHCPVCFLNKGLGISYGRKKRRQRRGP
 CM240 ME LVD PNI EP WNHFG SQPTT ACNHCYCK-KCCNHCQLCFLNKGLGISYGRKKRPHRGT
 96BW ME PVD PNI EP WKHPG SQPDTACTKCYCK-YCCYHCLVCFQTKGLGISYGRKKRRQRRST

60-----70-----80-----90-----100
 OyiC22 P QNSKTHQVS LSKOPASQPRGDPTGPKE SKKKVERET--DPED
 HxB2 H QNSQTHQAS LSKOPTSQPRGDPTGPKE-KKKVERETETDPED
 Ug1LRP T QSNKQTHNP I PKQPIPRTO GISTGPESKKKVEDKTETDRRD
 ELI P QGGQATHQP I PKQPSQPRGDPTGPKEQKKVES TATDPE
 CM240 P QSSKDTHNP I PKOPLPIRRMPTDPKESKKEVASKAETDQCD
 96BW P P SSE SHQNL I SEQPLPRTQGMPTGSEESKKKVESKTEADP

Figura 1

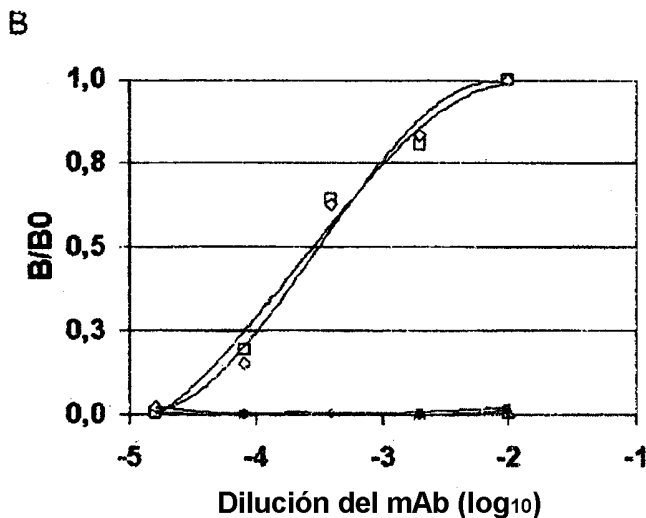
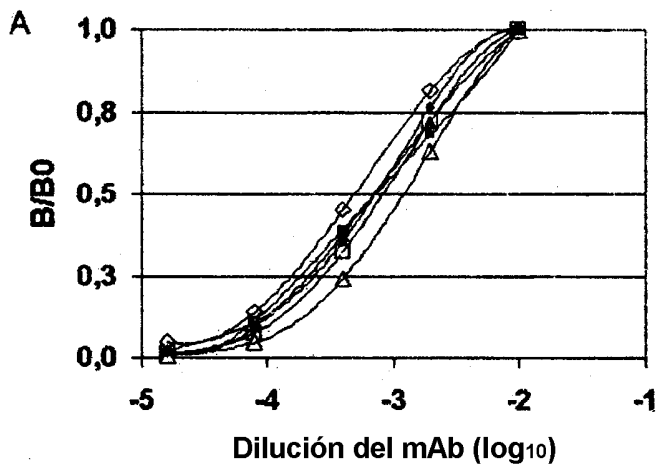


Figura 2

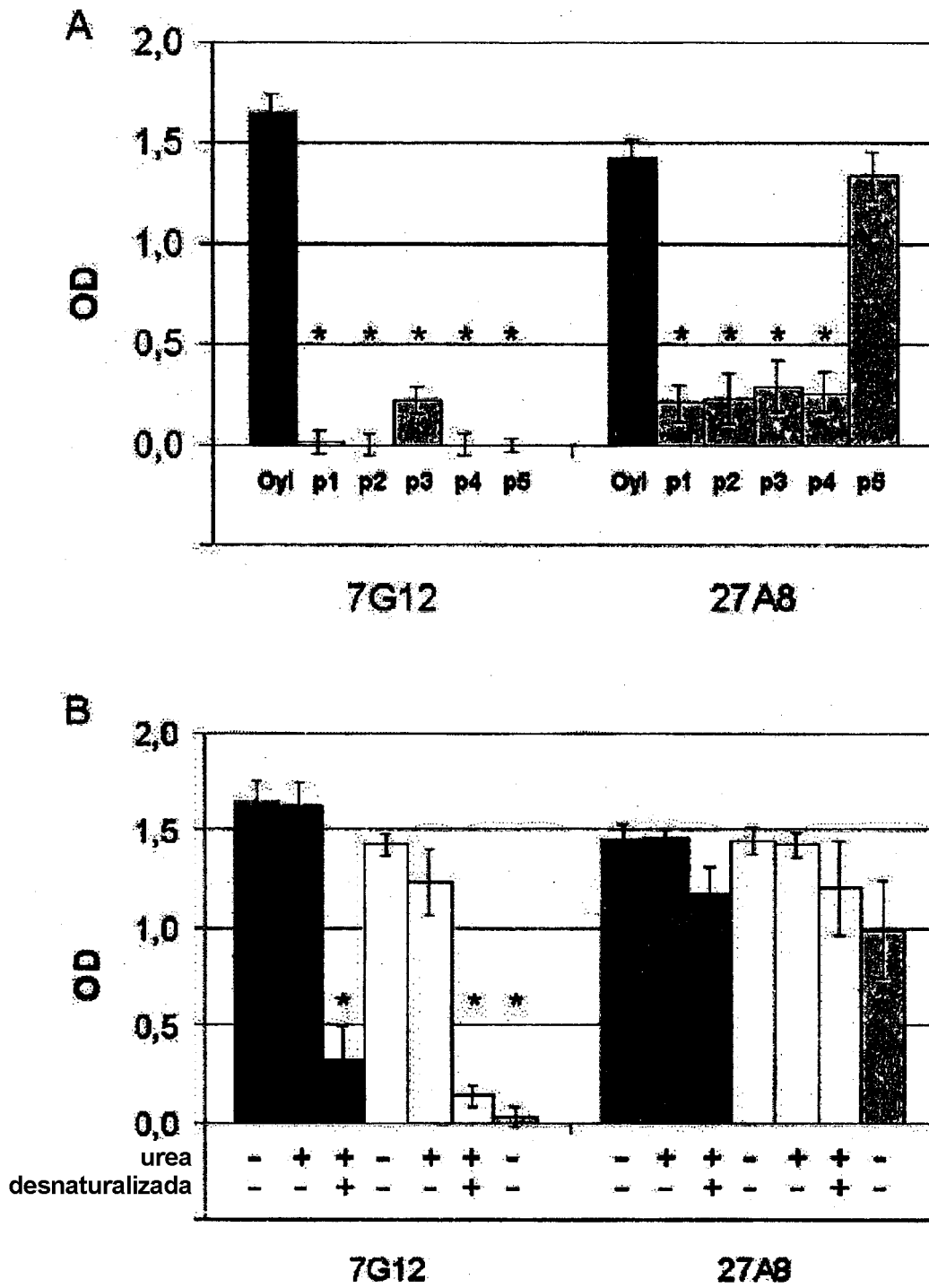


Figura 3

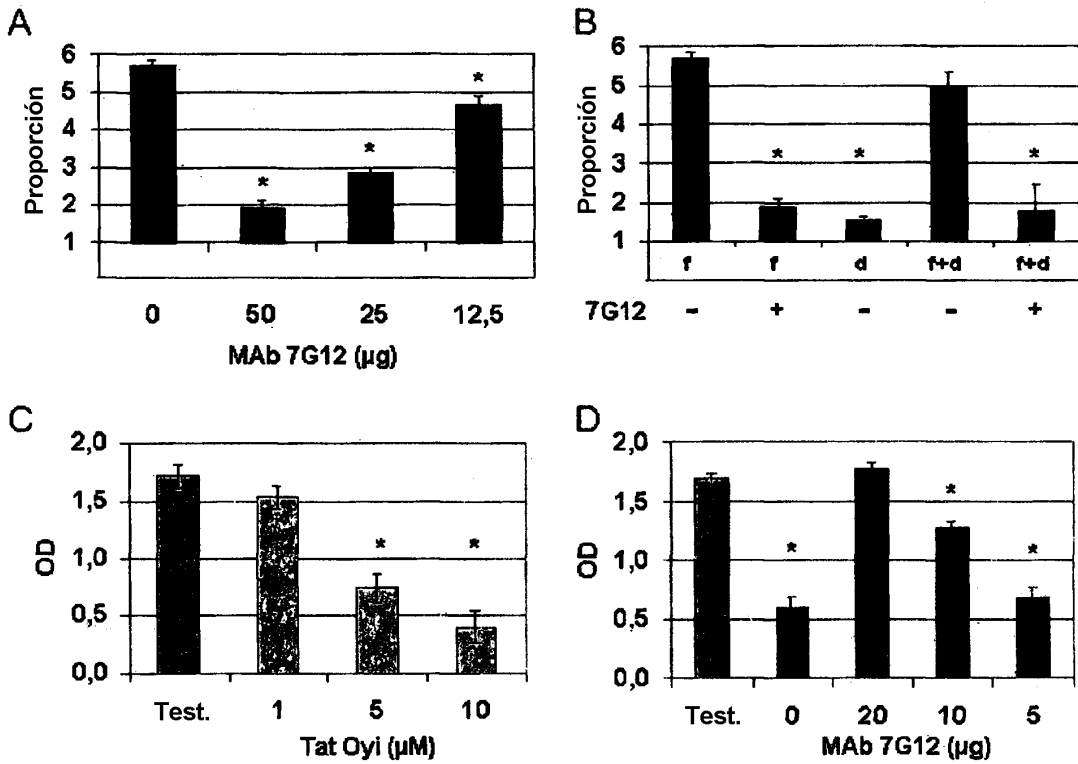


Figura 4

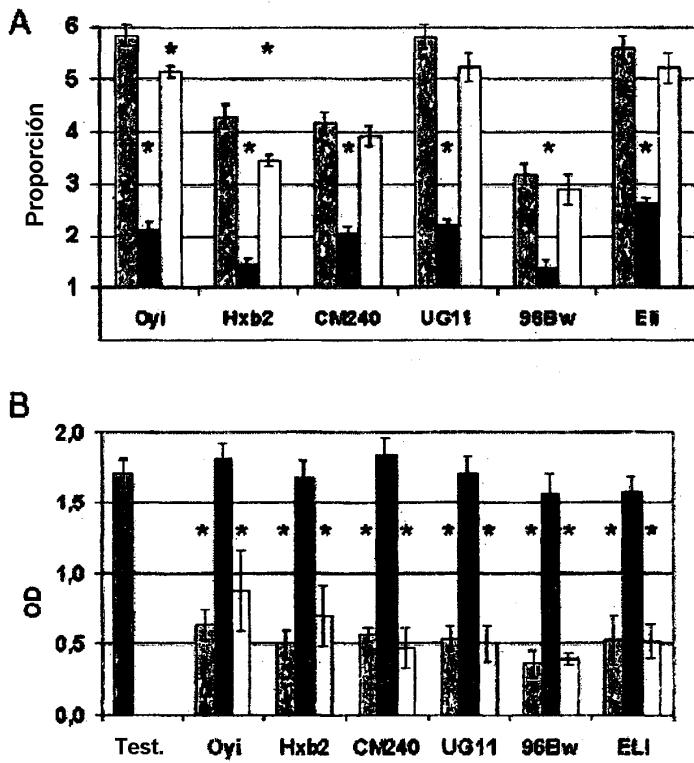


Figura 5