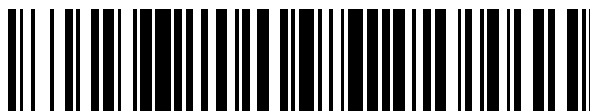


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 865**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2008 E 08852125 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2230250**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal anti-VIH**

30 Prioridad:

19.11.2007 JP 2007299083

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

16.02.2016

73 Titular/es:

**KUMAMOTO UNIVERSITY (100.0%)
39-1 KUROKAMI 2-CHOME
KUMAMOTO-SHI KUMAMOTO 860-8555, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUSHITA, SHUZO y
YOSHIMURA, KAZUHISA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 559 865 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal anti-VIH

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que tiene una actividad de neutralizar el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

10 Antecedentes técnicos

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es un estado patológico causado por infección crónica con un lentivirus llamado virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En los últimos años, se ha desarrollado un agente antiviral para inhibir el crecimiento del VIH, y por tanto se ha vuelto posible inhibir el inicio del SIDA. Sin embargo, incluso usando un agente antiviral fuerte, aún es difícil curar por completo el VIH, y el tratamiento antiviral necesita seguirse de por vida. Por otra parte, se ha vuelto claro que tales agentes antivirales son problemáticos en términos de la aparición de virus resistentes a fármacos y toxicidad crónica causada por el uso a largo plazo de los mismos. Según esto, el tratamiento antiviral actual todavía es insuficiente. Además, tales agentes antivirales son caros, y por tanto el uso a largo plazo de los mismos es sustancialmente imposible en países en desarrollo. En tales circunstancias el desarrollo de una vacuna para la prevención de la infección por VIH ha sido una cuestión mundial, y además, se ha deseado desarrollar un nuevo agente terapéutico que no tenga efectos secundarios.

Se han descrito varios anticuerpos monoclonales que neutralizan la infección por VIH (Burton, DR. et al., Nat. Immunol. 5, pp. 233-236, 2004; Zolla-Pazner, S. et al., Nat. Rev. Immunol. 4, pp. 199-210, 2004; Eda, Y. et al., J. Virol. 80: 5552-5562, 2006). Dependiendo de sus moléculas diana, tales anticuerpos monoclonales se clasifican en sentido amplio en: anticuerpos contra la región variable tal como V1/V2 o V3 de una proteína de la envuelta de VIH gp120; anticuerpos contra el sitio de unión a CD4 (CD4bs) de los mismos; y anticuerpos contra CD4i (epítipo que aparece después de la unión CD4-gp120). Por otra parte, también se ha publicado la actividad neutralizante de un anticuerpo contra la MPR (región proximal de membrana) de una proteína transmembrana gp41. Entre estos anticuerpos, los anticuerpos que parece que muestran una reacción cruzada incluyen: 447-52D y KD-247 en el caso de anticuerpos contra V3; b12 en el caso de anticuerpo contra CD4bs; 2F5 y 4E10 en el caso de anticuerpos contra gp41-MPR; y 2G12 en el caso de anticuerpos anti-glicano. Los anticuerpos contra V3 tienen reactividad cruzada, pero estos anticuerpos han sido problemáticos en que las cepas víricas con las que pueden reaccionar son limitadas. Por otra parte, puesto que los anticuerpos contra gp41-MPR han tenido una reacción cruzada con muchas cepas clínicamente aisladas, se han convertido en un foco de atención durante los últimos años. Sin embargo, se ha descrito recientemente que tales anticuerpos dan reacción cruzada con los lípidos de membrana de las células huéspedes, y que, de hecho, un anticuerpo da reacción cruzada con gp41 de VIH. Además, b12 tiene una parte CD3 larga que consiste en 18 aminoácidos, y por tanto, se ha sugerido su reactividad cruzada con un autoantígeno (Haynes, BF et al., Science 308, pp. 1906-1908, 2005).

Documento de no patente 1: Burton, DR. et al., Nat. Immunol. 5, pp. 233-236, 2004;
Documento de no patente 2: Zolla-Pazner, S. et al., Nat. Rev. Immunol. 4, pp. 199-210, 2004;
Documento de no patente 3: Eda, Y. et al., J. Virol. 80: 5552-5562, 2006;
Documento de no patente 4: Haynes, BF et al., Science 308, pp. 1906-1908, 2005.

El documento WO 92/07878 divulga los anticuerpos monoclonales 1125H y 4117C que se unen a gp120 y que tienen actividades neutralizantes. El anticuerpo monoclonal 4117C se une al bucle V3 de gp120. El anticuerpo monoclonal 1125H se une al sitio de unión a CD4 de gp120.

El documento 93/19786 divulga un anticuerpo monoclonal 5145A que se une al sitio de unión a CD4 de gp120. El documento también describe que 5145A y 4117C neutralizan sinérgicamente las cepas de VIH MN y SF-2.

Divulgación de la invención**55 Problemas que se van a resolver por la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar un anticuerpo monoclonal que tiene una actividad neutralizante sobre una amplia gama de cepas de VIH.

60 Medios para resolver los problemas

Una razón para no desarrollar una vacuna para la prevención de la infección por VIH es que no se ha clarificado aun un anticuerpo neutralizante eficaz. Mientras tanto, algunos casos de infecciones por VIH no progresivas a largo plazo, que no han progresado durante un largo periodo de tiempo, muestran una actividad neutralizante sobre una amplia gama de cepas víricas y controlan el crecimiento de los virus. Para examinar los tipos de anticuerpos neutralizantes que actúan eficazmente en tales casos de infección por VIH no progresiva a largo plazo en los que el

VIH no ha progresado durante un largo periodo de tiempo, los presentes inventores han inmortalizado células B en sangre periférica con virus EB, seguido por clonación, de modo que se produzca una línea productora de anticuerpo monoclonal. Estudiando las propiedades del anticuerpo monoclonal obtenido de esta manera, se puede revelar una reacción antiviral eficaz para los casos no progresivos a largo plazo. Además, el anticuerpo monoclonal obtenido también se puede aplicar al desarrollo de vacunas o agentes terapéuticos nuevos.

Por tanto, la presente invención proporciona la siguiente invención.

(1) Un anticuerpo monoclonal que reconoce el bucle V3 de la glucoproteína de la envuelta gp120 del virus del SIDA, que es cualquiera seleccionado de los siguientes anticuerpos:

- (a) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL); y
- (b) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL).

(2) Un anticuerpo monoclonal que reconoce el sitio de unión a CD4 de la glucoproteína de la envuelta gp120 del virus del SIDA, que es cualquiera seleccionado de los siguientes anticuerpos:

- (a) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL);
- (b) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL); y
- (c) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL).

(3) Un anticuerpo monoclonal que reconoce el bucle V3 de la glucoproteína de la envuelta gp120 del virus del SIDA, que está producido por células que tienen el número de acceso FERM BP-11021 o el número de acceso FERM BP-11060, o un fragmento del mismo.

(4) Un anticuerpo monoclonal que reconoce el sitio de unión a CD4 de la glucoproteína de la envuelta gp120 del virus del SIDA, que está producido por células que tienen el número de acceso FERM BP-11020, el número de acceso FERM BP-11022 o el número de acceso FERM BP-11023.

(5) Una célula que produce el anticuerpo de (1), que tiene el número de acceso FERM BP-11021 o el número de acceso FERM BP-11060.

(6) Una célula que produce el anticuerpo de (2), que tiene el número de acceso FERM BP-11020, el número de acceso FERM BP-11022 o el número de acceso FERM BP-11023.

(7) Un agente para uso en prevenir y/o tratar infección por VIH, que comprende al menos un anticuerpo monoclonal seleccionado de los anticuerpos de (1) a (4).

(10) Un agente para uso en prevenir y/o tratar infección por VIH, que comprende la combinación del anticuerpo monoclonal de (1) o (3) y el anticuerpo monoclonal de (2) o (4).

(9) El anticuerpo según (1 (a)) y el anticuerpo según (2 (a)) para uso combinado en la prevención y/o tratamiento de infección por VIH.

(10) Medicamento que comprende el anticuerpo según (1 (a)) y el anticuerpo según (2 (a)).

Efectos de la invención

El anticuerpo monoclonal de la presente invención es útil como un agente para prevenir y/o tratar SIDA/infección por VIH-1. Además, el anticuerpo monoclonal de la presente invención también es útil como un reactivo usado para estudiar el desarrollo de una vacuna de VIH inducible por anticuerpo neutralizante.

Mejor manera para llevar a cabo la invención

De aquí en adelante, se describirán las formas de realización y métodos de la presente invención.

1. Anticuerpo monoclonal de la presente invención

Una primera forma de realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que reconoce el bucle V3 de la glucoproteína de la envuelta gp120 del virus del SIDA, que es cualquiera seleccionado de los siguientes anticuerpos:

- (a) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL); y
- (b) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL).

Un ejemplo específico del anticuerpo anteriormente mencionado es un anticuerpo monoclonal que reconoce el bucle V3 de la glucoproteína de la envuelta gp120 del virus del SIDA, que está producido por células que tienen el número de acceso FERM BP-11021 o el número de acceso FERM BP-11060, o un fragmento del mismo.

Una segunda forma de realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que reconoce el sitio de unión a CD4 de la glucoproteína de la envuelta gp120 del virus del SIDA, que es cualquiera seleccionado de los siguientes anticuerpos:

- (a) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL);
- (b) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL); y
- (c) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL).

Un ejemplo específico del anticuerpo anteriormente mencionado es un anticuerpo monoclonal que reconoce el sitio de unión a CD4 de la glucoproteína de la envuelta gp120 del virus del SIDA, que está producido por células que tienen el número de acceso FERM BP-11020, el número de acceso FERM BP-11022 o el número de acceso FERM BP-11023.

Las células que producen los anticuerpos monoclonales 3D6(0.5δ), 5G2, 42F9 y 49G2 descritas en los ejemplos de la presente especificación se depositaron cada una con el Depositario Internacional de Organismos de Patente, el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, una Institución Administrativa independiente bajo el Ministerio de Economía, Comercio e Industria, en AIST Tsukuba Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japón, con los números de acceso FERM BP-11020, FERM BP-11021, FERM BP-11022, y FERM BP-11023, respectivamente, el 17 de septiembre de 2008. Las células productoras del anticuerpo monoclonal 1C10(0.5γ) descritas en los ejemplos de la presente especificación se depositaron con el Depositario Internacional de Organismos de Patente, el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, una Institución Administrativa independiente bajo el Ministerio de Economía, Comercio e Industria, en AIST Tsukuba Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japón, con el número de acceso FERM BP-11060 (número de recepción FERM ABP-11060), el 7 de noviembre de 2008.

El término "anticuerpo" se usa en la presente especificación para incluir no solo un anticuerpo de longitud entera sino también un fragmento de anticuerpo. Un fragmento de anticuerpo es preferiblemente un fragmento funcional, y ejemplos de tales fragmentos de anticuerpo incluyen $F(ab')_2$ y Fab' . $F(ab')_2$ y Fab' son productos obtenidos tratando una inmunoglobulina con proteasa (por ejemplo, pepsina, papaína, etc.). Tal fragmento de anticuerpo se produce por digestión de una inmunoglobulina antes y después de un enlace disulfuro existente entre dos cadenas H en una región bisagra. Además, cuando se usa el término "fragmento de anticuerpo", también incluye una proteína que contiene un sitio de unión a antígeno derivado de un gen que codifica el anticuerpo.

Por ejemplo, si se trata IgG1 con papaína, se corta en un sitio antes de un enlace disulfuro existente entre dos cadenas H en una región bisagra, de modo que se producen dos fragmentos de anticuerpo homólogos, en los que el fragmento de la cadena L que consiste en VL (una región variable de la cadena L) y CL (una región constante de la cadena L) se une a un fragmento de la cadena H que consiste en VH (una región variable de la cadena H) y CH_1 (una región γ_1 en una región constante de la cadena H) a través de un enlace disulfuro en una región C-terminal. Cada uno de estos dos fragmentos de anticuerpo homólogos se denominan Fab' . Por otra parte, si IgG se trata con pepsina, se corta en un sitio posterior a un enlace disulfuro existente entre dos cadenas H en una región bisagra, de modo que se produce un fragmento de anticuerpo que el ligeramente mayor que los dos fragmentos Fab' anteriormente mencionados que se unen entre sí en una región bisagra. Este fragmento se denomina $F(ab')_2$.

Además, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar como un anticuerpo inmovilizado que se inmoviliza en un soporte insoluble tal como un soporte de fase sólida, o como un anticuerpo marcado que está marcado con una sustancia marcadora. Tal anticuerpo inmovilizado y anticuerpo marcado se incluyen todos en el ámbito de la presente invención.

El término "anticuerpo inmovilizado" se usa para querer decir un anticuerpo que está en un estado en el que el anticuerpo está apoyado en un soporte insoluble a través de adsorción física, enlace químico, etc. Tal anticuerpo inmovilizado se puede usar para detectar, cuantificar, separar, o purificar un antígeno contenido en una muestra (por ejemplo, una muestra de líquido corporal tal como plasma, un sobrenadante de cultivo, un sobrenadante centrifugado, etc.). Los ejemplos de un soporte insoluble que se puede usar para inmovilizar un anticuerpo incluyen: (1) un plástico que consiste en una resina de poliestireno, una resina de policarbonato, una resina de silicona, una resina de nailon o similar; una placa que consiste en una sustancia insoluble en agua, tal como un vidrio como un ejemplo típico; un producto que tiene un volumen interno, tal como un tubo de ensayo o un tubo; perlas, una bola, un filtro, o una membrana; y (2) soportes insolubles usados en cromatografía de afinidad, tal como un soporte de celulosa, un soporte de agarosa, un soporte de poli(acrilamida), un soporte de dextrano, un soporte de poliestireno, un soporte de alcohol polivinílico, un soporte de poliaminoácido, o un soporte de sílice porosa.

El término "anticuerpo marcado" se usa para querer decir un anticuerpo que está marcado con una sustancia marcadora. Tal anticuerpo marcado se puede usar para detectar o cuantificar un antígeno contenido en una muestra (por ejemplo, una muestra de líquido corporal tal como plasma, un sobrenadante de cultivo, un sobrenadante centrifugado, etc.). El tipo de sustancia marcadora que se puede usar en la presente invención no está particularmente limitada, siempre que sea capaz de unirse a un anticuerpo a través de un enlace físico, un enlace químico, etc., de modo que se detecte la presencia del mismo. Los ejemplos específicos de tales sustancias marcadoras incluyen una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia quimioluminiscente, biotina, avidina, y un radioisótopo. Ejemplos más específicos de tal sustancia marcadora incluyen: enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, β -D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, penicilinas, catalasa, apoglucosa oxidasa, ureasa, luciferasa o acetilcolina esterasa; sustancias fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína, ficobiliproteína, quelato de metales tierras raras, cloruro de dansilo o isotiocianato de tetrametilrodamina; radioisótopos tales como ^3H , ^{14}C , ^{125}I o ^{131}I ; y biotina, avidina o sustancias quimioluminiscentes. Como un método para unir una sustancia marcadora a un anticuerpo, se puede usar un método conocido tal como un método de glutaraldehído, un método de maleimida, un método de disulfuro de piridilo o un método de ácido peryódico.

En el presente documento, un radioisótopo y una sustancia fluorescente pueden generar señales detectables por ellas mismas. Por otra parte, puesto que una enzima, una sustancia quimioluminiscente, biotina, y avidina no pueden generar señales detectables por ellas mismas, reaccionan con uno o más tipos de otras sustancias, y como resultado, generan señales detectables. Por ejemplo, una enzima necesita al menos un sustrato, y por tanto se usan varios tipos de sustratos dependiendo del tipo de método para medir la actividad enzimática (un método colorimétrico, un método fluorescente, un método bioluminiscente, un método quimioluminiscente o similar). Además, En el caso de biotina, generalmente se deja reaccionar con al menos avidina o avidina modificada con enzima. Se usan además varios tipos de sustancias colorantes, dependiendo de los sustratos anteriormente mencionados, según sea necesario.

2. Célula que produce el anticuerpo monoclonal de la presente invención

La presente invención también se refiere a una célula que produce el anticuerpo monoclonal anteriormente mencionado de la presente invención. El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede producir usando tal célula. Un método para obtener una célula que produce el anticuerpo monoclonal de la presente invención se describirá a continuación.

Se recuperan linfocitos incluyendo linfocitos B de la sangre periférica de un paciente infectado por VIH por un método de centrifugación densitométrica habitual o similar, y los linfocitos recuperados se transforman después con EBV para obtener a partir de los linfocitos una línea celular que produce establemente un anticuerpo y crece continuamente sin limitaciones. EBV es un virus capaz de transformar linfocitos B humanos normales a una línea celular proliferativa (Nature, Vol. 269, P. 410 (1973)). Como un material que contiene EBV, se puede usar una línea celular de tití B95-8 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 87, pp. 3333-3337 (1990)). Primero, usando un tubo de recogida de sangre que contiene heparina, la sangre periférica se recoge de un paciente infectado por VIH no progresivo a largo plazo que tiene una actividad neutralizante sobre una amplia gama de cepas de VIH, y una fracción de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se recoge después de la sangre periférica según un método de centrifugación densitométrica o similar. A partir de la CMSP obtenida, las células CD8 positivas se eliminan según una separación inmunomagnética usando Dynabeads. La CMSP con CD8 eliminadas se resuspendió en un medio (suero fetal de ternera al 15%; RPMI1640 que contiene SFT) que contiene el 50% de sobrenadante de cultivo de la línea celular productora del virus EV B95-8 (ATTC), y lo resultante se transfiere después a una placa de cultivo de 24 pocillos (Linbro, ICN). Después de ello, se cultiva a 37°C en un incubador que contiene CO₂ al 5% durante 12 a 18 horas. Durante esta operación de cultivo, las células B en la sangre periférica se infectan con el virus EB, y como resultado, se pueden obtener células inmortalizadas a una tasa de 1 cepa/10⁴

células. Se recupera un sobrenadante de cultivo de células que crecen, y las células recuperadas se criban después mediante un ensayo de captura de gp120. Con respecto a los clones que se determina repetidamente que son positivos como resultado de la operación de cribado, las células se clonan por un método de dilución limitante, usando células obtenidas aplicando rayos X a las CMSP de una persona sana como células nutritivas, y como resultado, se pueden separar células productoras de anticuerpos que tienen una actividad anti-gp120. Si es necesario, tales procedimientos de clonación se llevan a cabo repetidamente.

Cultivando la línea celular transformada con EBV obtenida de esta manera, se puede obtener el anticuerpo monoclonal de la presente invención de interés a partir de las células. El anticuerpo en la solución de cultivo se purifica, por ejemplo, combinado apropiadamente métodos conocidos tales como cromatografía de intercambio aniónico en DEAE, cromatografía de afinidad, un método de fraccionamiento de sulfato de amonio, un método de fraccionamiento de PEG, y un método de fraccionamiento de etanol, según sea necesario.

3. Gen del anticuerpo de la presente invención

Se puede obtener un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención produciendo una genoteca de ADNc usando ARNm derivado de las células humanas transformadas con EBV descritas anteriormente que producen el anticuerpo monoclonal de la presente invención, y después aislando un plásmido que contiene el ADNc que codifica el anticuerpo monoclonal de la presente invención de ellas. El ARNm anteriormente mencionado se puede preparar cultivando las células transformadas con EBV y después disolviendo las células en una solución de isotiocianato de guanidinio, seguido por extracción. Después de ello, se produce el ADNc usando el ARNm obtenido como molde, y el ADNc se incorpora después a un vector, de modo que se produce la genoteca de ADNc. Usando esta genoteca de ADNc, se puede obtener un gen que codifica el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

Además, puesto que se han determinado la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de tal gen que codifica el anticuerpo de la presente invención en los ejemplos siguientes, el gen que codifica el anticuerpo de la presente invención también se puede producir aplicando un método de síntesis química de genes que conocen los expertos en la materia. Por ejemplo, en el caso de genes que comprenden cada uno secuencias de nucleótidos adecuadas que codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 1 y 2, y las secuencias de nucleótidos complementarias a las mismas, tales genes se dividen en varios oligonucleótidos, se sintetizan después químicamente, y se ligan sucesivamente entre sí, según sea apropiado, en cada bloque, produciéndose de esta manera el gen que codifica el anticuerpo de la presente invención.

El gen que codifica el anticuerpo monoclonal de la presente invención se inserta en un vector de expresión, de modo que se construye un vector de expresión recombinante. En general, un vector de expresión tiene una región promotora antes del codón de inicio de la traducción (ATG) y también tiene una región de señal poli(A) después de un codón de terminación de la traducción (TAA, TGA o TAG). Se introduce un vector de expresión recombinante en células huéspedes según un método conocido, y las células huéspedes transformadas de esta manera se cultivan después, de modo que el anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede expresar. Como tales células huésped se pueden usar células de *Escherichia coli*, levadura o animal, o similares. Cultivando las células huésped transformadas, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede producir en el cultivo.

4. Medicamento que comprende el anticuerpo monoclonal de la presente invención

Usando un soporte, excipiente, diluyente y similar farmacéuticamente aceptable adecuado, según sea necesario, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar como un agente para prevenir y/o tratar una infección por VIH. Como tal agente para prevenir y/o tratar una infección por VIH, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede formular en forma de una inyección, por ejemplo. La dosis del agente para prevenir y/o tratar una infección por VIH depende del grado de síntomas, edad, y peso corporal de un paciente, un método de administración, y similar. El peso del anticuerpo usado como principio activo en general es desde aproximadamente 10 ng hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal.

5. Detección de epítipo del virus VIH usando el anticuerpo monoclonal de la presente invención

Según la presente invención, también es posible detectar VIH llevando a cabo un inmunoensayo usando el anticuerpo monoclonal de la presente invención o un fragmento del mismo. Este método preferiblemente comprende al menos los siguientes pasos (a) y (b):

- (a) un paso de dejar que el anticuerpo monoclonal de la presente invención o un fragmento del mismo reaccione con una muestra; y
- (b) un paso de dejar que el complejo antígeno-anticuerpo formado en el paso (a) reaccione con un anticuerpo marcado usado para la detección.

Como el método de detección y/o cuantificación de la presente invención, se puede aplicar cualquier método, siempre que sea un ensayo que usa un anticuerpo, es decir, un inmunoensayo. Los ejemplos del presente método de detección y/o cuantificación incluyen un enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), un inmunoensayo

fluorescente, un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo luminiscente, una técnica de anticuerpo con enzima, una técnica de anticuerpo con fluorescencia, una inmunonefelometría, una reacción de aglutinación en látex, un método de turbidimetría en látex, una hemaglutinación, una aglutinación de partículas, y un método de inmunotransferencia.

5 Cuando el método de detección de la presente invención se lleva a cabo aplicando un método de inmunoensayo usando un anticuerpo marcado, tal como un enzimoimmunoanálisis de adsorción, un inmunoensayo fluorescente, un radioinmunoensayo o un inmunoensayo luminiscente, también se puede llevar a cabo mediante un método en sándwich o un método de competición. En el caso de tal método en sándwich, puede ser adecuado si al menos uno de un anticuerpo en fase sólida y un anticuerpo marcado es el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

10 Cuando el anticuerpo se usa en un estado en el que se sensibiliza a un soporte en fase sólida, los ejemplos del soporte en fase sólida que se pueden usar en el presente documento incluyen partículas que consisten en materiales tales como poliestireno, un copolímero de estireno-butadieno, un polímero de éster de ácido (met)acrílico, látex, gelatina, un liposoma, una microcápsula, eritrocito, sílice, alúmina, negro de carbón, un compuesto metálico, metal, cerámica, o un cuerpo magnético.

15 Como un método de sensibilización, se puede aplicar un método conocido tal como un método de adsorción física, un método de enlace químico, o el uso combinado de estos métodos. Las operaciones de medida se pueden llevar a cabo según métodos conocidos. Cuando la medida se lleva a cabo por un método óptico, por ejemplo, una muestra se deja reaccionar con un anticuerpo, o una muestra se deja reaccionar con un anticuerpo que se ha sensibilizado a un soporte de fase sólida, y se mide después una luz transmitida o una luz dispersada por un método de criterio de valoración o un método de velocidad.

20 Cuando la medida se lleva a cabo por observación visual, una muestra se deja reaccionar con un anticuerpo que se ha sensibilizado a un soporte de fase sólida en un recipiente tal como una placa o una placa de microtitulación, y después de ello, el producto de reacción que está en un estado aglutinado se observa visualmente. En lugar de llevar a cabo la medida por observación visual, también puede ser posible llevar a cabo la medida usando un aparato tal como un lector de microplacas.

25 La presente invención se describirá más específicamente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, no se pretende que estos ejemplos limiten el ámbito de la presente invención.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de anticuerpo monoclonal neutralizante

Se infectaron células B de sangre periférica con el virus EB, y después una operación de clonación se llevó a cabo repetidamente, de modo que se separaron las células productoras de anticuerpo que tenían una actividad anti-gp120. Este método de producción de células se creó básicamente modificando un método que se había aplicado a un caso de infección por virus de leucemia de células T humanas de tipo 1 (HTLV-1) (Matsushita S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83: 3672-3676, 1986). Se recogió sangre periférica de un paciente infectado por VIH no progresivo a largo plazo que tenía una actividad neutralizante sobre una amplia gama de cepas víricas, y se colocó en un tubo de recogida de sangre con heparina (20 a 30 ml). Después de ello, se aisló una fracción de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante un método de centrifugación en gradiente de densidad usando Ficoll-Hypaque. De las CMSP obtenidas, se eliminaron las células positivas para CD8 según una separación inmunomagnética usando Dynabeads. Específicamente, las CMSP se incubaron con Dynabeads CD8 durante 1 hora a 4°C, y las bolas magnéticas se eliminaron con un dispositivo magnético, de modo que se obtuvieron CMSP con CD8 eliminadas. Las CMSP sin CD8 (de 1 a 10 x 10⁶) se resuspendieron en de 2 a 5 ml de un medio (suero fetal de ternera al 15%; RPMI1640 que contenía SFT) que contenía sobrenadante de cultivo al 50% de la línea celular productora del virus EB B95-8 (ATCC), y lo resultante se transfirió después a una placa de cultivo de 24 pocillos (Linbro, ICN). Después de ello, se cultivó a 37°C en un incubador que contenía CO₂ al 5% durante 12 a 18 horas. Durante esta operación de cultivo, las células B en la sangre periférica se infectaron con el virus EB, y como resultado, se consideró que se obtuvieron células inmortalizadas a una tasa de 1 cepa/10⁴ células. Las células cultivadas se recogieron y después se centrifugaron, y el medio antiguo se desechó. Las CMSP sin CD8 se dosificaron en un medio reciente en una placa de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Falcon), de modo que la concentración de CMSP pudiera ser 1 x 10⁴ o menos por pocillo. La mezcla obtenida se cultivó adicionalmente a 37°C en un incubador que contenía CO₂ al 5%. Mientras se intercambiaba la mitad del medio con uno reciente cada 7 a 10 días, se esperó el crecimiento de una línea de células B. Las células en crecimiento se expandieron en una placa de cultivo de 48 pocillos o 24 pocillos (Linbro, ICN). Se recuperó un sobrenadante de cultivo de las células en crecimiento, y se cribó después mediante el "ensayo de captura de gp120" posteriormente mencionado. Con respecto a los clones que se determinó repetidamente que eran positivos como resultado de la operación de cribado, las células se clonaron por un método de dilución limitante, usando las células obtenidas aplicando rayos X a las CMSP de una persona sana como células nutritivas, y las células productoras de anticuerpo que tenían actividad anti-gp120 se separaron. Si era necesario, tales procedimientos de clonación se llevaron a cabo repetidamente.

Ejemplo 2: ELISA de captura de gp120

El "ELISA de captura de gp120" se aplicó para cribar las células productoras de anticuerpo que tenían una actividad anti-gp120 (J. P. Moore et al., J. Virol. 67, pp. 6136-6151, 1993). Específicamente, el día antes del experimento, se añadieron 50 µl de anticuerpo de oveja anti-gp120-C5 (D7324; Aalto Bioreagents, Dublín, Irlanda) cuya concentración se había ajustado para ser 13,3 µg/ml con la adición de un tampón CC (tampón carbonato-bicarbonato, pH 9,6) a una placa de polipropileno de 96 pocillos (Falcon), y después se dejó en reposo a 4°C durante la noche. Después de ello, se eliminó un sobrenadante, y se añadieron al residuo 175 µl de un tampón de bloqueo (seroalbúmina bovina al 2%, BSA, acida al 0,1%, PBS, pH 7,2). La mezcla obtenida se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de ello, el pocillo se lavó con un tampón de lavado de ELISA (Tween20 al 0,15%, PBS, pH 7,2) tres veces, y después se añadieron al mismo 50 µl de cada uno de gp120 monomérica (gp120-SF2; Austral Biologicals, San Ramon, California). La mezcla obtenida se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de ello, lo resultante se lavó con el tampón de lavado de ELISA tres veces, de modo que se produjo un "placa de gp120 capturada". Se añadió un sobrenadante de cultivo de células B a esta placa, y la mezcla después se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Lo resultante se lavó con el tampón de lavado de ELISA tres veces, y 100 µl de anti-IgG humana-ALP, que se había diluido por un factor de 1000 con el tampón de ELISA se añadieron después a lo resultante. La mezcla obtenida se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Lo resultante se lavó con el tampón de lavado de ELISA tres veces. Se disolvió sustrato de fosfatasa (SIGMA) en un tampón de sustrato (tampón dietanolamina, pH 9,85) y se añadieron después 100 µl de la solución obtenida a cada pocillo, seguido por dejar la mezcla en reposo a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos. Después de ello, se midió la absorbancia (405 nm) con un lector de microplacas. Por tanto, 20 tipos de clones de células B capaces de producir anticuerpos unidos a gp120 (tabla 1).

[Tabla 1]

Tabla 1: Lista de anticuerpos monoclonales neutralizantes que se obtuvieron de un paciente infectado por VIH no progresivo a largo plazo.

No.	Clon	Subclase	Diana
1	0.5γ(1C10)	IgG1 κ	V3L
2	1D9	IgG2 κ	V3L
3	2F8	IgG1 λ	V3L
4	3E4	IgG2 κ	V3L
5	3G8	IgG2 κ	V3L
6	5G2	IgG1 κ	V3L
7	0.5δ(3D6)	IgG1 λ	CD4bs
8	4E3	IgG1 κ	CD4bs
9	7B5	IgG2 λ	CD4bs
10	42F9	IgG1 κ	CD4bs
11	49G2	IgG1 λ	CD4bs
12	4C11	IgG2 λ	CD4i
13	4E9B	IgG2 κ	CD4i
14	5D6S12	IgG2 κ	CD4i
15	7F11	IgG2 κ	CD4i
16	5E8	IgG2 κ	ND
17	7B9N	IgG3 κ	ND
18	9F7	IgG1 κ	ND
19	39D5	IgG3 κ	ND
20	43D7	IgG2 κ	ND

Ejemplo 3: Clasificación de los anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos que reaccionan con gp120 se clasifican en los siguientes 4 tipos, dependiendo de los tipos de epítopos reactivos. Específicamente, los 4 tipos son un sitio de unión a CD4 (CD4bs), un epítipo inducido por CD4 (CD4i), un tercer bucle variable (bucle V3; V3L), y los que no se pueden clasificar en los grupos anteriormente mencionados (otros epítopos). Si un anticuerpo se une o no a V3L se determina por ELISA usando un péptido sintético que tiene la secuencia de aminoácidos de V3L (ELISA de péptido V3). En este experimento, se usó la secuencia de V3 de la cepa JR-FL (NNT20; NNTRISIHIGPGRAFVTIGK), que era la más próxima a la secuencia de V3 del virus de un caso del que se derivó el anticuerpo. El día antes del experimento 100 µl de un péptido (NNT20) diluido en PBS a una concentración de 5 µg/ml se añadió a cada pocillo de una placa de polipropileno de 96 pocillos, y después se dejó a 4°C durante la noche. Después de lavar, se añadieron 175 µl de un tampón de bloqueo a cada pocillo, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La placa se lavó con un tampón de lavado de ELISA tres veces, y después se añadió a los pocillos un sobrenadante de cultivo de células B diluido en serie. La placa se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de ello, la placa se lavó con el tampón de lavado de ELISA tres veces, y lo resultante se hizo reaccionar después con 100 µl de anti-IgG humana-ALP

durante 1 hora. Después de lavar el resultado, se desarrolló el color usando sustrato de ALP, y después se midió la absorbancia (405 nm). El ELISA de péptido V3 se realizó en los 20 tipos de anticuerpos obtenidos. Como resultado, se encontró que 6 tipos de anticuerpos tenían reactividad con el péptido V3.

5 Por otra parte, CD4 soluble (sCD4; R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN) ejerce influencias completamente opuestas en un anticuerpo contra CD4bs y un anticuerpo contra CD4i. Es decir, la reactividad del anticuerpo contra CD4bs se suprime en presencia de sCD4. En contraste, la reactividad del anticuerpo contra CD4i con gp120 aumenta en presencia de sCD4. Utilizando esta propiedad, se clasificaron los anticuerpos monoclonales. Se preparó la "placa de gp120 capturada" por los mismos procedimientos que los mencionados anteriormente para el ELISA de captura de
10 gp120. Se hicieron reaccionar anticuerpos monoclonales diluidos en serie en presencia o ausencia de sCD4 0,5 µg/ml durante 2 horas, y después se lavaron con un tampón de lavado de ELISA tres veces. Después de ello, los anticuerpos resultantes se dejaron reaccionar cada uno con 100 µl de anti-IgG humana-ALP durante 1 hora. Después de lavarlos, se desarrolló el color usando sustrato de ALP, y después se midió la absorbancia (405 nm). Como se muestra en la figura 1, todos los anticuerpos contra V3 incluyendo KD-247 usado como un control no estaban influidos por sCD4. La actividad de cinco tipos de clones (0.5δ(3D6), 42F9, 49G2, 4E3 y 7B5) se suprimió en presencia de sCD4 (en donde b12 se usó como control). En contraste, la reactividad de cuatro tipos de clones (4C11, 4E9B, 5D6S, y 7E11) aumentó en presencia de sCD4 (en donde 17b se usó como control). Hubo cinco tipos de clones, que no mostraron reactividad en el ELISA de péptido V3 y no estuvieron influidos por sCD4. No se pudo confirmar que estos clones tuvieran especificidad de epítipo (otros epítipos).

20 Ejemplo 4: Actividad de unión a una envuelta funcional

Se ha sabido que el VIH-1 tiene una envuelta funcional que causa la fusión de membrana con células diana en partículas víricas y en las superficies de células crónicamente infectadas. Para estudiar si el anticuerpo producido es capaz o no de reconocer esta envuelta funcional, se examinó la actividad de unión del anticuerpo a la superficie celular de células infectadas crónicamente con VIH-1_{JR-FL} (PM1/JR-FL) con un citómetro de flujo. Además, también se examinó si sCD4 tenía o no influencia en esta reactividad. Se colocaron células PM1/JR-FL (2×10^5) en un tubo de ensayo. Después de ello, se añadieron al tubo de ensayo 50 µl de sCD4 que se había diluido con un tampón de FACS (BSA al 2%, acida al 0,02% en PBS, pH 7,23) y ajustado a una concentración de 1 µg/ml, o 50 µl de solo el
30 tampón de FACS. La mezcla se dejó reaccionar durante 15 minutos. Después de ello, 50 µl de anticuerpo monoclonal diluido en tampón de FACS a una concentración de 1 a 3 µg/ml se añadieron entonces a la mezcla de reacción, y la mezcla obtenida se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Lo resultante se lavó con un tampón de FACS dos veces, y 50 µl de anticuerpo anti-IgG humana unido a FITC (Sigma) diluido en un tampón de FACS a una proporción de 1:200 se añadieron después a lo resultante. La mezcla se incubó a 4°C en un lugar oscuro durante 30 minutos. Después de ello, lo resultante se lavó con un tampón de FACS dos veces, y después se fijó con 0,5 ml de solución de fijación {paraformaldehído al 2% (p/v) en PBS}. La muestra fijada se analizó con FACScalibur (Beckton-Dickinson). Los datos incorporados se analizaron con Cell Quest (Beckton-Dickinson). Como se muestra en la figura 2, se encontró que los 5 tipos de anticuerpos contra V3L todos tenían una actividad de unión clara a la superficie de las células infectadas. Además, tal actividad de unión aumentaba en presencia de sCD4. Cuando se compararon con los cuatro clones, 1D9, 2F8, 3E4 y 3G8, 1C10(0.5y) y 5G2 tenían reactividad fuerte en ausencia de sCD4. Entre los anticuerpos clasificados en CD4bs 3D6(0.5δ), 42F9 y 49G2 tenían una actividad de unión a la superficie de células infectadas. Sin embargo, 4E3 y 7B5 no tenían tal actividad de unión. A diferencia de la reacción con el monómero de gp120, en el caso de una envuelta funcional que consiste en un trímero, no se observó la inhibición de la unión de los anticuerpos contra CD4bs por sCD4. Por otra parte, con respecto a los anticuerpos contra CD4i, los 4 tipos de anticuerpos todos tenían solo reactividad débil en ausencia de sCD4, pero en presencia de sCD4, tal reactividad aumentó hasta el nivel equivalente a la reactividad de un anticuerpo contra V3. Todos los 5 tipos de anticuerpos cuyos epítipos no se han identificado no tenían actividad de unión a la superficie de células infectadas.

50 Ejemplo 5: Purificación de anticuerpo neutralizante y estudios respecto a la actividad neutralizante

Con respecto a los 20 tipos de anticuerpos, su actividad de unión a la superficie celular, la cantidad de anticuerpo producido, y similar se tomaron en consideración. Como resultado, respecto a 15 tipos de anticuerpos, el número de células se aumentó, se recogió un sobrenadante de cultivo y después se filtró, y un anticuerpo monoclonal se purificó después usando una columna de proteína A o columna de proteína G (GE Healthcare). Se examinó la actividad neutralizante del anticuerpo monoclonal así purificado en virus VIH-1 pseudotipados a concentraciones de anticuerpo de 10 µg/ml y 2 µg/ml, usando las envueltas de 4 tipos de cepas de VIH-1 comúnmente usadas en laboratorios (figura 3). Para producir tal virus pseudotipado, el día antes de la transfección, se dispersaron células 293T en una placa de 100 mm recubierta de colágeno (IWAKI) a una concentración de células de 4×10^6 , y se cultivaron a 37°C durante la noche. Después de ello, 5 µg de pNL4-3-Luc-E_R o 5 µg de pSG3ΔEnv (Li M. et. al, J. Virol.79, pp.10108-10125, 2005), 4,5 µg de un vector de expresión de la envuelta, y 0,5 µg de un vector pRSV-REV se introdujeron en el cultivo usando Effectene (QIAGEN), y la mezcla obtenida se cultivó después a 37°C en CO₂ al 5%. Veinticuatro horas después del inicio del cultivo, se recuperó un sobrenadante y después se pasó a través de un filtro de 0,2 µm. Después de ello, se dosificó y después se conservó a -80°C. El virus pseudotipado obtenido se sometió a un kit de ELISA de antígeno p24 (ZeptoMetrix Co.) para medir la cantidad de antígeno p24. Se llevó a cabo un experimento de neutralización de una sola ronda usando el virus pseudotipado como sigue. El día antes del

experimento, se dispersaron células GHOST-hi5 o células TZM-bl en una placa de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Falcon) a una concentración de 2×10^4 células/200 μ l. Cuando las células habían crecido aproximadamente al 70% de confluencia, se mezclaron 200-500 TCID₅₀ de virus pseudotipado y el anticuerpo en cada concentración con DMEM que contenía suero fetal de ternera (SFT) al 10%, G418 0,1 mg/ml, higromicina-B 0,05 mg/ml, puromicina 5 μ g/ml, y polibreno 20 μ g/ml (en el caso de GOST-hi5), o contenía SFT al 10%, DEAE-dextrano 10 μ g/ml (Pharmacia Biotech; en el caso de TZM-bl). La mezcla obtenida se dejó en reposo en hielo durante 15 minutos. Después de ello, 100 μ l de la solución mezcla anticuerpo/virus se añadió a células diana, de las que se había eliminado la solución de cultivo, y la mezcla obtenida se incubó a 37°C en CO₂ al 5% durante 2 horas, de modo que el virus se adsorbió en las células diana. Después de ello, 100 μ l del anteriormente mencionado DMEM que contenía antibióticos y similares se añadió además, y la mezcla se cultivó después a 37°C en CO₂ al 5% durante 2 días. Después de ello, se eliminó un sobrenadante, y el residuo se lavó después con PBS (pH 7,4) tres veces. A continuación, 30 μ l de un tampón de lisis (Luc PGC50; TOYO INK MFG CO., LTD. (en el caso de GHOST-hi5)) diluido por un factor de 5 con PBS, o una solución de lisado (Applied Biosystems (en el caso de TZM-bl)), se añadió a lo resultante, y la mezcla obtenida se agitó durante 15 minutos. Después de ello, 20 μ l de la solución de reacción se transfirieron a una placa usada para medida luminiscente (Coster 3912), y 100 μ l de un sustrato de luciferasa (PicaGene; TOYO INK MFG CO., LTD.) se añadieron a la misma. Diez segundos después de la adición del sustrato de luciferasa, la intensidad de fluorescencia se midió con un luminómetro de microplaca TR477 (Applied Biosystems) (en el caso de GHOST-hi5). En el caso de las células TZM-bl, después de que se transfiriera la solución de reacción a la placa usada para la medida luminiscente, 100 μ l de Galacto-Star (Applied Biosystems) diluido por un factor de 50 con un diluyente de tampón de reacción se añadió a la misma, y la mezcla obtenida se dejó después en reposo durante 1 hora en un lugar oscuro. Después de ello, la actividad β -galactosidasa se midió con el luminómetro de microplaca TR477. La actividad neutralizante se calculó según la expresión $\{1-(t-c)/(n-c)\} \times 100$ (t: la intensidad de fluorescencia de una muestra; c: la intensidad de fluorescencia de fondo de células solo; n: el intensidad de fluorescencia de una muestra sin anticuerpos). El experimento se llevó a cabo en triplicado a la misma concentración de anticuerpo. Un experimento independiente se llevó a cabo repetidamente 2 o 3 veces cada uno.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3. Casi todos los anticuerpos monoclonales examinados mostraron actividad neutralizante en la cepa SF162, que se sabe que tiene alta sensibilidad neutralizante. Por otra parte, respecto a las cepas 89.6 y JR-FL, que eran relativamente resistentes a la neutralización, los anticuerpos contra V3 {particularmente, 0.5 γ (1C10) y 5G2} mostraron actividad neutralizante, pero los anticuerpos contra CD4bs y anticuerpos contra CD4i mostraron solo actividad neutralizante débil. Mientras tanto, los anticuerpos contra V3 no eran eficaces para IIIB en el que la secuencia de aminoácidos de la punta de V3 se diferencia de los de otros virus, pero algunos anticuerpos contra CD4bs y CD4i mostraron actividad neutralizante. Estos datos sugieren que la actividad neutralizante cruzada en varias cepas de VIH-1 en casos de tener los anticuerpos anteriormente mencionados está causada principalmente por la neutralización complementaria entre los anticuerpos contra V3 y los anticuerpos contra CD4bs. Entre los anticuerpos monoclonales anteriormente mencionados, los anticuerpos contra V3, 0.5 γ (1C10) y 5G2, y los anticuerpo contra CD4bs, 0.5 δ (3D6), 49G2 y 42F9, mostraron una fuerte actividad neutralizante. Se llevó a cabo un experimento de neutralización adicional.

Ejemplo 6: Estudios respecto a la actividad neutralizante en 17 tipos de cepas víricas incluyendo cepas clínicamente aisladas

Se estudió la actividad neutralizante en 17 tipos de cepas víricas incluyendo cepas clínicamente aisladas (tabla 2). Para este experimento de neutralización, se aplicó el siguiente ensayo de MTT. Como método, 2×10^3 células PM1/CCR5 se infectaron con 100 TCID₅₀ de virus en presencia del anticuerpo en cada concentración en una placa de microcultivo de fondo redondo de 96 pocillos, y las células se cultivaron después a 37°C durante 7 días. Después de ello, se eliminaron 100 μ l de una solución de cultivo de cada pocillo, y 10 μ l de una solución de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) disuelta en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (7,5 mg/ml) se añadieron después a la misma. La mezcla obtenida se incubó a 37°C durante 3 horas. Después de ello, 100 μ l de isopropanol acidificado que contenía Triton X-100 al 4% (vol/vol) se añadieron a cada pocillo, de modo que se liberara cristal de formazán. Se midió la absorbancia (570 nm) con un lector de microplaca, y se calculó la tasa de supervivencia celular. Este experimento se repitió 2 o 3 veces. Se calculó la concentración de anticuerpo necesaria para inhibir el 50% de la infección del virus (CI₅₀), y la concentración de anticuerpo correspondiente a tal CI₅₀ se indicó con código de color.

Las actividades neutralizantes de anticuerpos en varias cepas de VIH-1 incluyendo cepas clínicamente aisladas se muestran en la tabla 2. La actividad del clon 5G2 era equivalente a la un anticuerpo KD-247 como estado de la técnica. Sin embargo, un anticuerpo anti-V3, 0.5 γ (1C10) y los anticuerpo contra CD4bs, 0.5 δ (3D6), y 49G2 mostraron una amplia gama de actividad neutralizante fuerte en VIH-1 de subtipo B (tipo occidental). Se debe indicar que las cepas, que no fueron neutralizadas por el anticuerpo contra V3 0.5 γ (1C10), fueron neutralizadas por los anticuerpo contra CD4bs, 0.5 δ (3D6), y 49G2. Es decir, se observó una neutralización complementaria.

[Tabla 2]

Tabla 2: Actividad neutralizante de anticuerpo monoclonales en 17 tipos de virus

	Uso coRc	Subtipo	Acm anti-V3			Acm contra Cd4bs		Acm contra CD4i
			KD247	5G2	1C10	3D6	9G2	4C11
Cepas de laboratorio (virus CXCR4-trópico)								
IIIB	X4	B	>50	>50	>50	2	1,6	26
89.6	Dual	B	4,2	14	0,12	>50	5,8	15
Cepas de laboratorio (virus CCR5-trópico)								
SF162	R5	B	0,21	0,91	0,053	2,3	2,5	27
BaL	R5	B	3,8	5,8	0,25	>50	>50	37
JRFLwt	R5	B	12	37	2,9	>50	23	>50
JRFLGPER	R5	B	>50	>50	28	1,2	ND	ND
YU2	R5	B	>50	>50	14	>50	>50	>50
Cepas clínicamente aisladas (Japón)								
MTA	R5	B	0,08	0,008	0,53	0,15	0,0	0,31
MOKW	R5	B	0,11	0,012	0,02	0,42	2,2	19
YKI	R5	B	0,5	1	0,01	2,4	1	0,1
YIS	R5	B	>50	>50	0,59	2,3	1,8	>50
MIIS	R5	B	>50	>50	>50	0,15	0,25	18
kKGO	R5	B	>50	>50	0,32	>50	8,6	>50
KMT	X4	B	>50	>50	24	24	>50	>50
Cepas clínicamente aisladas (África)								
TR43	R5	G	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Cepas de VIH-2								
ROD	X4	VIH-2	>50	>50	>50	>50	>50	>50
EHO	X4	VIH-2	>50	>50	>50	>50	>50	>50

5

Ejemplo 7: Aumento de la reactividad de anticuerpos contra V3 por al anticuerpo contra CD4bs 0.5δ

Se sabe que gp120 experimenta cambio conformacional después de unirse a una molécula de CD4. Por otra parte, no se ha llevado a cabo casi ningún estudio respecto a si el anticuerpo contra CD4bs induce o no tal cambio en la estructura tridimensional de gp120. Los presentes inventores han considerado la posibilidad de que el anticuerpo contra CD4bs cause un cambio en la estructura tridimensional de gp120 después de que se haya unido a gp120, de modo que cambie la reactividad de otros anticuerpos. Se preparó una "placa de gp120 capturada" mediante el método de ELISA de captura de gp120 anteriormente mencionado. Después de ello, 0.5δ(3D6) como un anticuerpo contra CD4bs, o un anticuerpo control (8D11), se dejaron reaccionar con la misma a una concentración de 5 µg/ml durante 15 minutos. Posteriormente, los anticuerpos unidos a biotina (Pierce, Rockford, IL), 1C10, 3E4, 3D6 y 4C11, se dejaron reaccionar con los mismos a cada concentración durante 2 horas. Después de ello, lo resultante se lavó con un tampón de lavado de ELISA, después se dejó reaccionar con avidina-ALP (Zymed) durante 1 hora, y después se añadió un sustrato para el desarrollo del color. Los resultados se muestran en la figura 4. La reactividad de los anticuerpos contra V3 biotinilados, 0.5γ(1C10) y 3E4, con gp120 aumentó significativamente en presencia de 0.5δ. Por otra parte, la reactividad de los anticuerpos biotinilados, 0.5δ(3D6) y 4C11, se suprimió en presencia de 0.5δ. Por tanto, se encontró que el anticuerpo contra CD4bs, 0.5δ, causa un cambio en la estructura tridimensional a gp120 por sí mismo, y que expande drásticamente la reactividad de los anticuerpos contra V3 (particularmente 0.5γ).

Ejemplo 8: Efecto neutralizante sinérgico mediante el uso combinado de 0.5δ y 0.5γ

Como se ha descrito anteriormente, 0.5δ aumenta la reactividad de 0.5γ. Por tanto, se estudió el efecto de combinación de 0.5δ y 0.5γ respecto a la actividad neutralizante. Al combinar 0.5δ y 0.5γ en varias concentraciones, se analizó su actividad neutralizante en una cepa JR-FL por un ensayo de MTT. Como se muestra en la figura 5, como resultado del uso combinado de los dos anticuerpos, se observó el aumento sinérgico de la actividad neutralizante. Para analizar tal efecto sinérgico, se aplicaron el método de análisis de Chow/Talalay et al., y el método de análisis tridimensional. Como resultado de la observación *in vitro* de tales anticuerpos, se asumió que una reacción de neutralización más fuerte podría suceder como resultado de la interacción del anticuerpo contra V3 con el anticuerpo contra CD4bs *in vivo*. Basándose en tales datos, se consideró que tanto el anticuerpo contra V3 como el anticuerpo contra Cd4bs que reaccionan con una amplia gama de cepas son necesarios para una reacción de anticuerpo neutralizante amplia y fuerte.

Ejemplo 9: Actividad neutralizante en paneles de virus estándar internacionales

Para evaluar los datos respecto al desarrollo de la vacuna contra el SIDA en base internacional, los virus que sirven como estándar se decoran de un instituto en los Estados Unidos (NIAID ARRP). Los datos de neutralización obtenidos usando los paneles de virus del subtipo (clado) B (Paneles de virus estándar B; SVPB) que consistían en 12 tipos de virus pseudotipados se muestran en la tabla 3. Como se muestra en tabla 3, 0,5 γ (1C10) pudo suprimir el 50% o más del crecimiento de 7/12 virus a una concentración de 50 μ g/ml, y también fue capaz de suprimir el 50% o más del crecimiento de 10/12 virus a una concentración de 150 μ g/ml. Por otra parte, con respecto a los resultados de los anticuerpos del estado de la técnica, b12 suprimió el 50% o más del crecimiento de 8/12 virus, 2G12 suprimió el 50% o más del crecimiento de 6/12 virus, y 447-52D suprimió el 50% o más del crecimiento de 3/12 virus. Los datos de b12, 2G12 y 447-52D (447D) como anticuerpos del estado de la técnica se citaron en un artículo de estudio (Li M. et. al, J. Virol. 79, pp. 10108-10125, 2005). Los datos de b12 y 2G12 solo existen hasta una concentración de 50 μ g/ml, y los datos de 447-52D (447D) solo existen hasta una concentración de 25 μ g/ml. Por tanto, estos anticuerpos del estado de la técnica no se pueden usar necesariamente para una simple comparación. Sin embargo, aparentemente diferenciándose de estos anticuerpos del estado de la técnica, se encuentra que 0,5 γ (1C10) muestra una amplia actividad de neutralización. Además, b12 como un anticuerpo contra CD4bs tiene una amplia gama de actividad neutralizante, pero es un anticuerpo especial que tiene una CDR3 de cadena pesada, larga que consiste en 18 aminoácidos, que con frecuencia se observa en autoanticuerpos (Saphire EO. et al., Science 239, pp. 1155-1159). Por otra parte, 0,5 γ (1C10) tiene una CDR3 que consiste en 11 aminoácidos.

[Tabla 3]

Tabla 3: Actividad neutralizante de anticuerpos monoclonales en panel vírico estándar B (CI₅₀)

Panel estándar de virus pseudotipados	CI ₅₀ en células TZMbl (µg/ml)												
	1C10	1C10	3D6	9G2	2F9	3E4	5G2	2F8	KD247	8D11	IgGb12*	2G12*	447D*
SVPB5	0,23		1,2	2,1	4,5	>50	10,1	>50	1,8	>50	1,4	2	1,1
SVPB6	38		>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	0,3	2,8	>25
SVPB8	>50	>150	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	0,2	2,1	>25
SVPB11	35		>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	1,2	>25
SVPB12	>50	82	>50	7,8	>50	-	>50	>50	>50	>50	>50	0,4	>25
SVPB13	>50	110	>50	>50	>50	-	>50	>50	>50	>50	1,9	>50	>25
SVPB14	10,5		>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	0,1	>50	>25
SVPB15	>50	>150	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	0,5	>50	>25
SVPB16	6,1		>50	7,8	21	>50	>50	>50	>50	>50	0,7	>50	>25
SVPB17	4,5		>50	>50	>50	>50	50	>50	17	>50	>50	>50	>25
SVPB18	1,1		>50	>50	>50	>50	11,5	>50	28	>50	3,1	1,1	>25

* Los datos se tomaron de Li M. et. al, J. Virology, 79, pp. 10108-10125, 2005)

5

Ejemplo 10: Determinación de la secuencia génica del sitio de unión antígeno-anticuerpo del anticuerpo monoclonal

Los presentes inventores han determinado las secuencias génicas de los sitios de unión antígeno-anticuerpo de anticuerpos monoclonales neutralizantes (anti-V3: 0.5γ(1C10) y 5G2; CD4bs: 0.5δ(3D6), 42F9, 49G2). Los resultados se muestran en las figuras 6 a 10, y las SEQ ID NO: 1 a 20 en la lista de secuencias. Como método, se

10

extrajo ARN de cada línea celular, y se amplificaron VH y VL por PCR y después se identificaron según el método de Marks et al. (Marks, J. D. et. al., J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991).

- 5 SEQ ID NO: 1 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH) de 0.5γ(1C10)
 SEQ ID NO: 2 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL) de 0.5γ(1C10)
 SEQ ID NO: 3 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH) de 5G2
 SEQ ID NO: 4 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL) de 5G2
 SEQ ID NO: 5 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH) de 0.5δ(3D6)
 SEQ ID NO: 6 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL) de 0.5δ(3D6)
 10 SEQ ID NO: 7 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH) de 42F9
 SEQ ID NO: 8 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL) de 42F9
 SEQ ID NO: 9 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH) de 49G2
 SEQ ID NO: 10 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL) de 49G2
 SEQ ID NO: 11 Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena H (VH) de 0.5γ(1C10)
 15 SEQ ID NO: 12 Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena L (VL) de 0.5γ(1C10)
 SEQ ID NO: 13 Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena H (VH) de 5G2
 SEQ ID NO: 14 Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena L (VL) de 5G2
 SEQ ID NO: 15 Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena H (VH) de 0.5δ(3D6)
 SEQ ID NO: 16 Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena L (VL) de 0.5δ(3D6)
 20 SEQ ID NO: 17 Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena H (VH) de 42F9
 SEQ ID NO: 18 Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena L (VL) de 42F9
 SEQ ID NO: 19 Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena H (VH) de 49G2
 SEQ ID NO: 20 Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena L (VL) de 49G2

25 (Discusión)

Estos nuevos anticuerpos monoclonales todos muestran una amplia gama de fuerte actividad neutralizante en los virus de subtipo (clado) B. En particular, 0.5γ(1C10) se considera que es el mayor nivel de anticuerpo que se puede usar actualmente. Estos anticuerpos no solo desempeñan un papel importante en el desarrollo de vacunas, sino que los anticuerpo, los fragmentos de los mismos, o moléculas producidas basadas en los genes de los mismos también se pueden usar para la prevención y/o tratamiento de SIDA/infección por VIH.

Ejemplo 11: Estudios respecto a la actividad neutralizante en varios tipos de cepas víricas

35 Como con los paneles de virus de subtipo (clado) B (SVPB), también se han suministrado paneles de virus del subtipo C. Como se muestra en la figura 11, cuando se compara con un anticuerpo control, los anticuerpos contra CD4bs, 0.5δ(3D6), 49G2 y 42F9, mostraron una actividad neutralizante clara en dos virus (SVPC13 y SVPC15) entre los paneles de virus de subtipo C. Además, estos anticuerpos contra CD4bs mostraron actividad neutralizante también en virus de subtipo AE, 93TH976.17 y 93TH966.8. Los tres anticuerpos contra CD4bs anteriores mostraron una actividad neutralizante en virus diferentes de los virus del subtipo B. Por tanto, se considera que son importantes para los estudios de neutralización de clado cruzada por anticuerpos.

Los resultados se muestran en la figura 11. Los anticuerpos de la presente invención, 0.5δ(3D6), 49G2 y 42F9, mostraron una actividad inhibidora en los SVPC13, SVPC15, 93TH976.17 y 93TH966.8 examinados.

Ejemplo 12: Uso combinado de inhibidor de CCR5 y anticuerpo de la presente invención

Después de que gp120 se haya unido a CD4, V3 se une a un correceptor (CCR5 o CXCR4), de modo que el virus invade la célula. Se considera que V3 que sirve como epítipo de 0.5γ o 5G2 y un inhibidor de CCR5 (maraviroc, MVC) que sirve como un equivalente de unión al mismo son una combinación importante incluso desde el punto de vista de aplicación clínica. Por tanto, se examinó la actividad de neutralización de la combinación de anticuerpo contra V3 y el inhibidor de CCR5 (MVC) en la cepa JR-FL por un ensayo de MTT. Como se muestra en la figura 12, se observó que el aumento sinérgico de la actividad neutralizante se obtuvo por el uso combinado del anticuerpo contra V3 con MVC. Para el análisis de tal efecto sinérgico, se aplicó un método de análisis tridimensional. Como resultado de tal observación *in vitro*, se asume que el anticuerpo contra V3 interacciona con el inhibidor de CCR5, de modo que se produce un efecto supresor del virus más fuerte. Basándose en estos datos, se considera que el uso combinado del anticuerpo contra V3 con el inhibidor de CCR5 puede aumentar los efectos terapéuticos, cuando se administran clínicamente.

Los resultados se muestran en la figura 12. Mediante el uso combinado del anticuerpo de la presente invención 0.5γ(1C10) o 5G2, con el inhibidor de CCR5, se observó un efecto inhibitorio sinérgico en VIH-1JRFL.

Aplicabilidad industrial

65 El tratamiento actual de la infección por VIH (es decir, una terapia multifármaco que usa agentes antivirales; TARGA (terapia anti-retroviral de gran eficacia)) es capaz de suprimir el crecimiento del virus, pero no es capaz de curar la

enfermedad por completo. Una vez se ha iniciado el tratamiento, el paciente debe continuar con la TARGA. Puesto que los agentes antivirales son sustancias químicas, aparecen varias toxicidades a largo plazo en el tratamiento continuado durante un periodo de tiempo largo, y por tanto, se fuerza a los pacientes a terminar el tratamiento en muchos casos. En contraste, el anticuerpo de la presente invención es capaz de convertirse en la corriente principal de una nueva terapia (terapia de combinación) que no tiene efectos secundarios. Además, el anticuerpo de la presente invención también se puede usar como un reactivo necesario para el desarrollo de una vacuna eficaz.

Breve descripción de la figuras

- 10 La figura 1 muestra el análisis de la reactividad de un anticuerpo monoclonal por ELISA de captura de gp120.
La figura 2 muestra el análisis por FACS de la actividad de unión de cada anticuerpo en la superficie de una célula crónicamente infectada con VIH-1JR-FL (PM1/JR-FL).
- 15 La figura 3 muestra la actividad neutralizante cruzada de un anticuerpo monoclonal neutralizante en 4 tipos de virus pseudotipados en la envuelta.
La figura 4 muestra un aumento significativo en la reactividad de un anticuerpo contra V3 con gp120, que está causada por 0.5d(3D6).
- 20 La figura 5 muestra el efecto sinérgico de la combinación de 0.5g(1C10) con 0.5d(3D6) en la supresión de VIH-1JR-FL.
La figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos del sitio de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal 0.5γ(1C10) de la presente invención, y una secuencia de aminoácidos deducida.
- 25 La figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos del sitio de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal 5G2 de la presente invención, y una secuencia de aminoácidos deducida.
- 30 La figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos del sitio de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal 0.5δ(3D6) de la presente invención, y una secuencia de aminoácidos deducida.
La figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos del sitio de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal 42F9 de la presente invención, y una secuencia de aminoácidos deducida.
- 35 La figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos del sitio de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal 49G2 de la presente invención, y una secuencia de aminoácidos deducida.
- 40 La figura 11 muestra la actividad neutralizante del anticuerpo de la presente invención en tipos de cepas víricas.
La figura 12 muestra el efecto inhibitorio sinérgico obtenido por el uso combinado de un inhibidor de CCR5 con el anticuerpo de la presente invención.

Lista de secuencias

- 45 <110> Kumamoto University
- <120> Anticuerpo monoclonal anti-VIH
- <130> A81480A
- <160> 20
- 50 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> humano
- 55 <400> 1

ES 2 559 865 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Val Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Asn Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Leu Gly Gly Asp Arg Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 2

5

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Leu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Thr Leu Pro
 85 90 95
 Tyr Thr Leu Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105

<210> 3
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 3

10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ile Phe Ser Thr Ala
 20 25 30
 Asn Leu His Trp Leu Arg His Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly His Arg Gln Tyr Tyr Ala Asp Leu Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu His
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Gly Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Gly Ala Asp Glu Asn Asn Leu Gly Pro Ala Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 4

20

ES 2 559 865 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Gly Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Gly Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 5
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 5

5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Ala Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ala Gln Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asn Tyr Tyr Asp Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile Arg Asp Gly
 100 105 110
 Asp Tyr Ser Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser

<210> 6
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 6

10

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

15

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ser Ala Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Asp Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 7
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 7

20

ES 2 559 865 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Glu Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Thr Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Glu Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 8

5

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Phe Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Ile Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 9
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 9

10

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Pro Ile Ala Ala Ala Thr His Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15

<210> 10
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 10

20

ES 2 559 865 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ser Ala Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Asp Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 11

<211> 357

5 <212> ADN

<213> humano

<400> 11

gagggtgcagc	tgggtggagtc	tggaggaggt	ttgatccagc	ctgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggggt	cacagtcagt	agcagcagca	tgagctgggt	ccgccaggct	120
ccagagaagg	ggctggagtg	ggtctcagtt	gtttatagcg	gtgggaacac	atataacgca	180
gactcctgta	agggccgatt	cagcatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	ggtatatctt	240
cagatgaaca	gcctgagagc	cgacgacacg	gccgtgtatt	actgtgcgag	agatttaggg	300
gggggggacc	ggtcctctga	ctactggggc	cagggcacc	tggtcaccgt	ctcctca	357

10 <210> 12

<211> 327

<212> ADN

<213> humano

<400> 12

gacatccagt	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtgggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcaagtga	gagcattaac	acctatttaa	attggtatca	acagagacca	120
gggaaagccc	ctaaactcct	gatctatgct	gcatccactt	tacaaactgg	ggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacactt	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaggatcttg	caacttatta	ctgtcaacag	agtttcagta	ccctcccgtta	cactcttggc	300
cgggggacca	aggtggagat	caaaggt				327

15

<210> 13

<211> 369

<212> ADN

20 <213> humano

<400> 13

gagggtgcagc	tgggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccggc	ctgggaactc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggaat	catcttcagt	accgctaatt	tacactggct	ccgccacggt	120
ccaggcaagg	gcctggagtg	ggtggccatt	atttcatatg	atggccacag	acaatactac	180
gcagacctcg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	caccctgcat	240
ctgcaaatgg	acggcctgac	atctgacgac	acggctgtct	attattgtgc	gaaagacggg	300
gcagatgaga	acaatttagg	tcccgccttt	gactactggg	gccggggcac	cctggtcacc	360
gtctcctca						369

25 <210> 14

<211> 324

<212> ADN

<213> humano

<400> 14

gaaattgtgt	tgacgcagtc	tccagccacc	ctgtctgtat	caccagggga	aggagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtc	gagtattagc	agcaacttag	cctggtacca	gcagaagcct	120
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatggt	gcatccaccg	gggccactgg	tatcccagcc	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	actggagcct	240
gaagattttg	cgatttatta	ctgtcagcag	tatggtagtt	taccgataac	cttcggccaa	300
gggacacgac	tggagattaa	acgt				324

30

<210> 15

<211> 387

<212> ADN

ES 2 559 865 T3

<213> humano
 <400> 15
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgcagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacttttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttcagtg gatgggatgg atcagcgctt acaacggtaa cactaagttt 180
 gcacaagaat ttaagggcag agtcaccatg accacagaca catccgcgac cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attattgtgc gaggaggaat 300
 tactatgatt cggggagtta ttatattcgt gacggggact acagtatgga tgtctggggc 360
 caaggcacc tggtcaccgt ctctca 387

5 <210> 16
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> humano
 <400> 16
 cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgttctg gaagcggctc caacatcgga agtaatactg taaactggta ccagcagttc 120
 ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aataataatc agcggccctc aggggtccct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240
 tctgcggatg aggctgatta ttactgtgca acatgggatg acagcctgga tggttgggtg 300
 10 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggt 333

<210> 17
 <211> 377
 <212> ADN
 15 <213> humano
 <400> 17
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcctttggt gagtatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
 ccagggaaag ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atgggtgtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgcagggccg attcaccacc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggcctgt attactgtgc gagagatgag 300
 aattacgata ttttgactgg taactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctc 377

<210> 18
 20 <211> 324
 <212> ADN
 <213> humano
 <400> 18
 gacatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagetctt gatctatgct gcatecagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttttagt gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caactttcta ctgtcaacag agtcacagta tcccctaac ttttgccag 300
 25 gggaccaagc tggagatcaa acgt 324

<210> 19
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> humano
 30 <400> 19
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggacct 300
 atagcagcag caacctatgc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tca 363

<210> 20
 35 <211> 333
 <212> ADN
 <213> humano
 <400> 20

ES 2 559 865 T3

```
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcttgttctg gaagcggctc caacatcgga agtaatactg taaactggta ccagcagttc 120
ccaggaacgg cccccaact cctcatctat aataataatc agcggcctc aggggtccct 180
gaccgattct ctggctcaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240
tctgcggatg aggctgatta ttactgtgca acatgggatg acagcctgga tggttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggt 333
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal que reconoce el bucle V3 de la glucoproteína de la envuelta gp120 del virus del SIDA, que es cualquiera seleccionado de los siguientes anticuerpos:
 - (a) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL);
y
 - 10 (b) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL).
- 15 2. Un anticuerpo monoclonal que reconoce el sitio de unión a CD4 de la glucoproteína de la envuelta del virus del SIDA, que es cualquiera seleccionado de los siguientes anticuerpos:
 - (a) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL);
 - 20 (b) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL);
y
 - 25 (c) un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH), y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 como la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL).
- 30 3. Un anticuerpo monoclonal que reconoce el bucle V3 de la glucoproteína de la envuelta gp120 del virus del SIDA, que está producido por células que tienen el número de acceso FERM BP-11021 o el número de acceso FERM BP-11060, o un fragmento del mismo.
- 35 4. Un anticuerpo monoclonal que reconoce el sitio de unión a CD4 de la glucoproteína de la envuelta del virus del SIDA, que está producido por células que tienen el número de acceso FERM BP-11020, el número de acceso FERM BP-11022 o el número de acceso FERM BP-11023.
5. Una célula que produce el anticuerpo de la reivindicación 1, que tiene el número de acceso FERM BP-11021 o el número de acceso FERM BP-11060.
- 40 6. Una célula que produce el anticuerpo de la reivindicación 2, que tiene el número de acceso FERM BP-11020, el número de acceso FERM BP-11022 o el número de acceso FERM BP-11023.
- 45 7. Un agente para uso en prevenir y/o tratar infección por VIH-1, que comprende al menos un anticuerpo monoclonal seleccionado de los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 4.
8. Un agente para uso en prevenir y/o tratar infección por VIH-1, que comprende la combinación del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o 3 y el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 2 o 4.
- 50 9. El anticuerpo según la reivindicación 1 (a) y el anticuerpo según la reivindicación 2 (a) para uso combinado en la prevención y/o tratamiento de una infección por VIH.
10. Medicamento que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1 (a) y el anticuerpo según la reivindicación 2 (a).

Fig.1

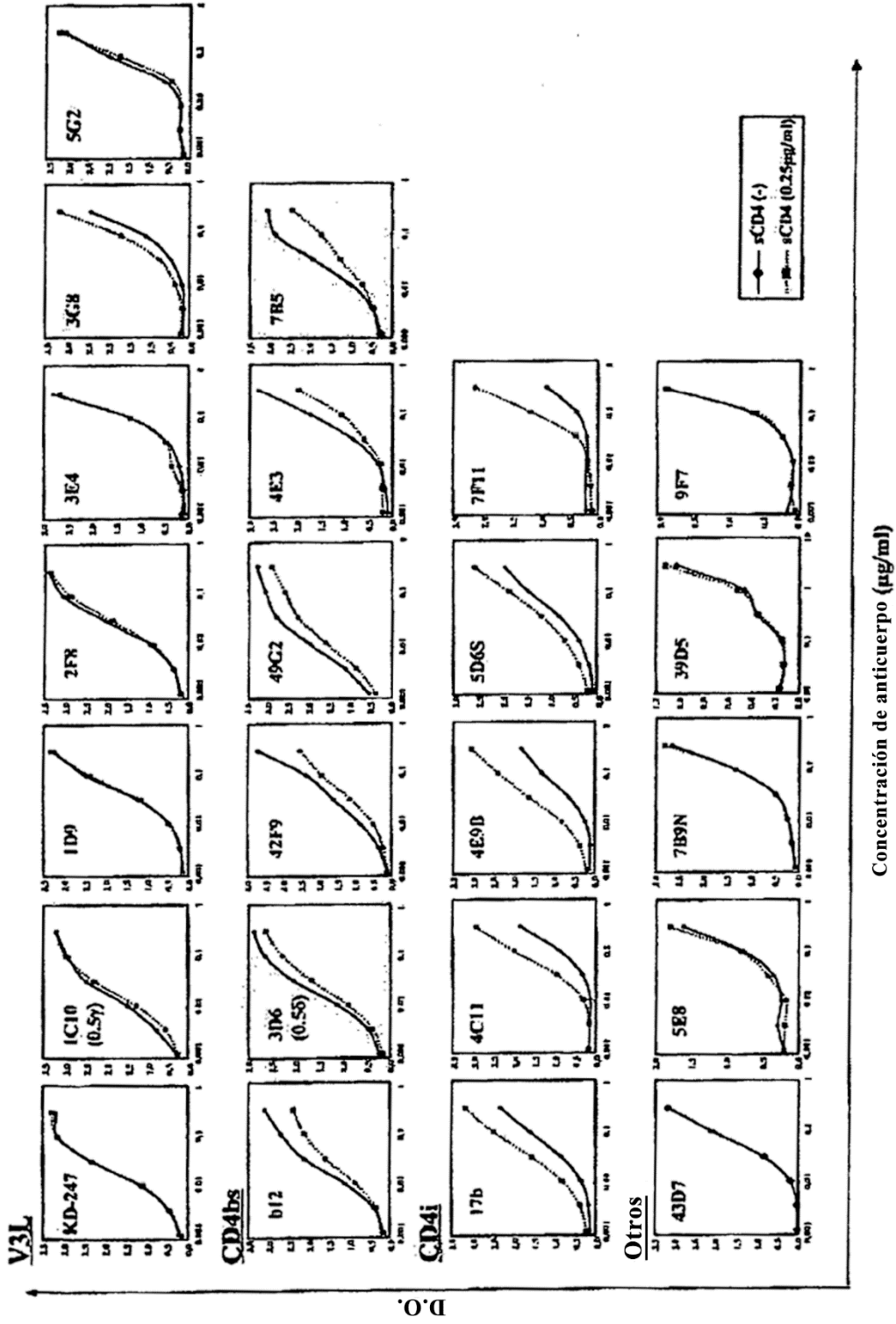


Fig. 1. Análisis de la reactividad de un anticuerpo monoclonal por ELISA de captura de gp120

Fig.2

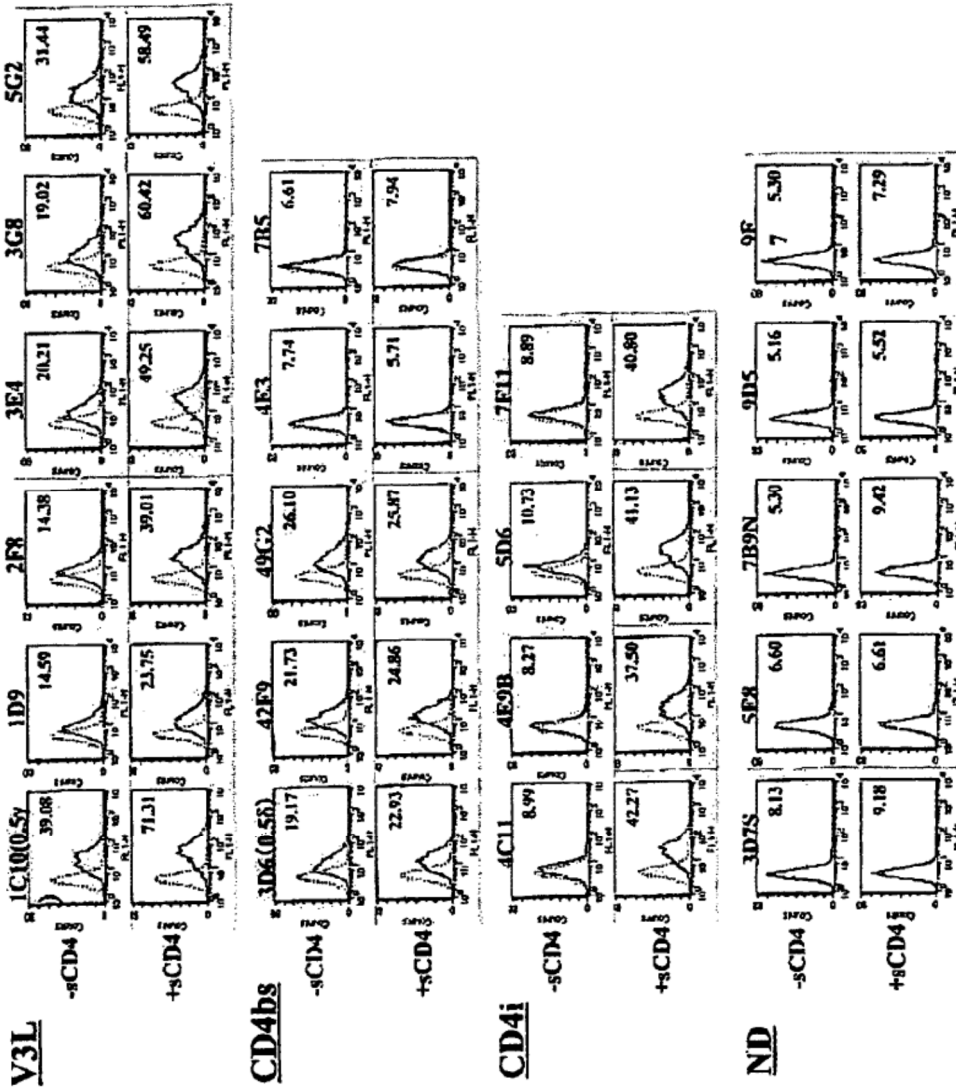


Fig.2 Análisis por FACS de la actividad de unión a la superficie de una célula crónicamente infectada por VIH-1JR-FL (PM1/JR-FL)

Fig. 3

Actividad neutralizante cruzada de un anticuerpo monoclonal neutralizante en 4 tipos de virus pseudotipados

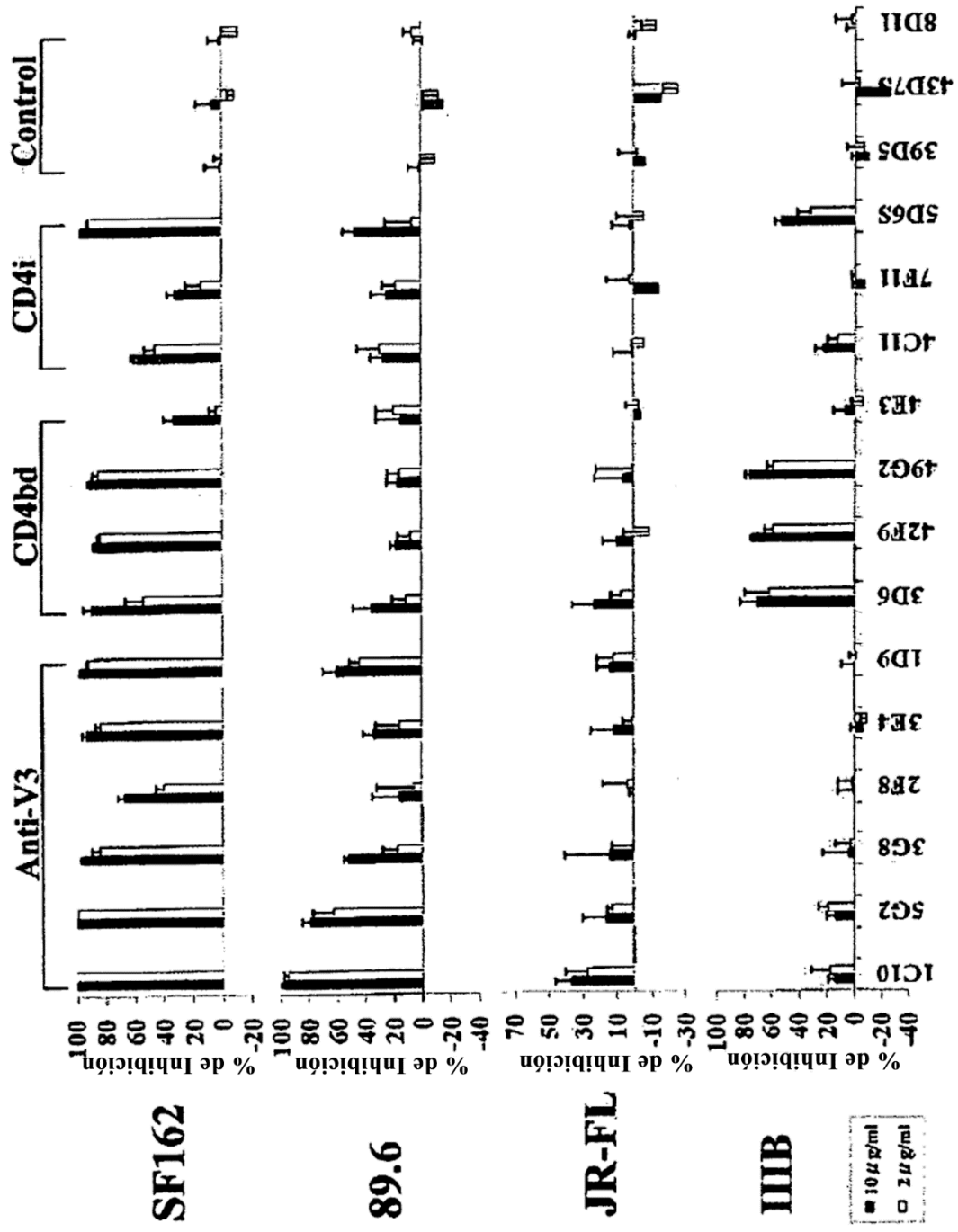


Fig.4

Fig.4 Aumento significativo en la reactividad de un anticuerpo de V3 con gp120, que está causadp por 0.5d(3D6)

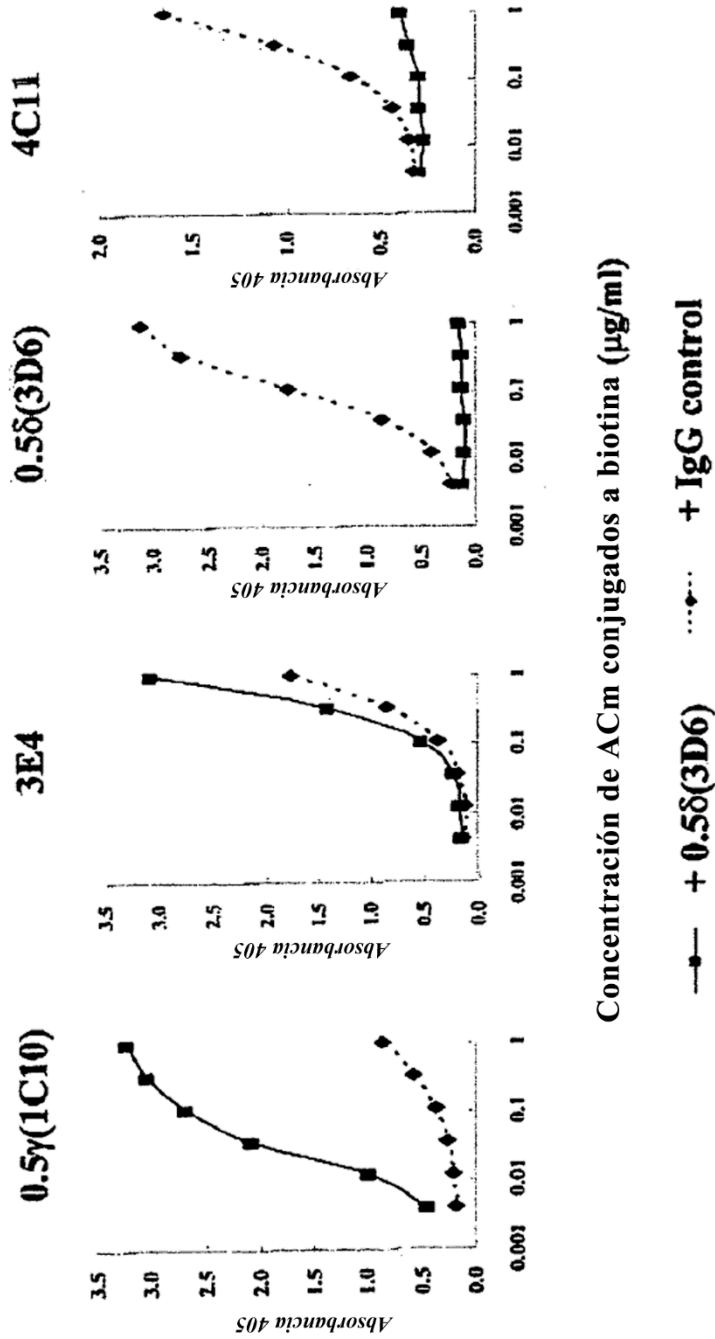
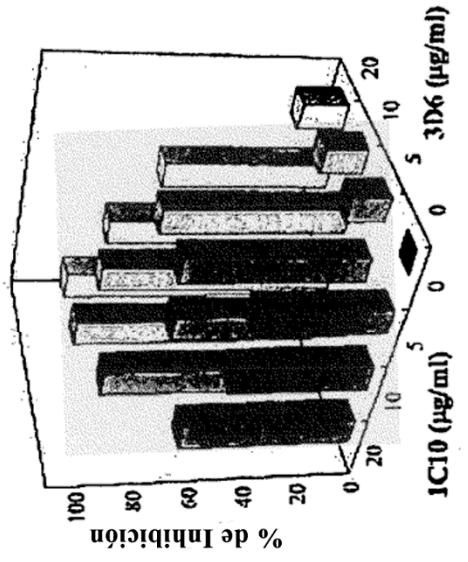
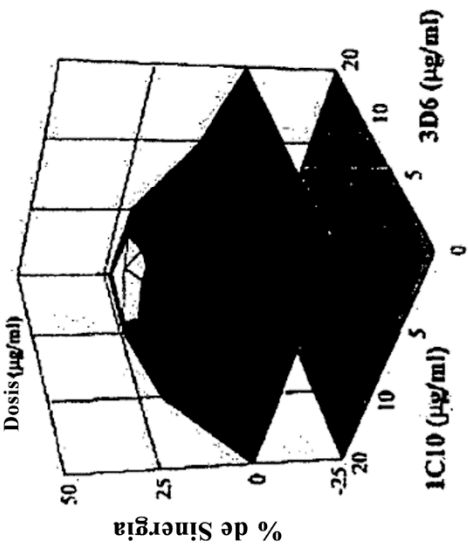
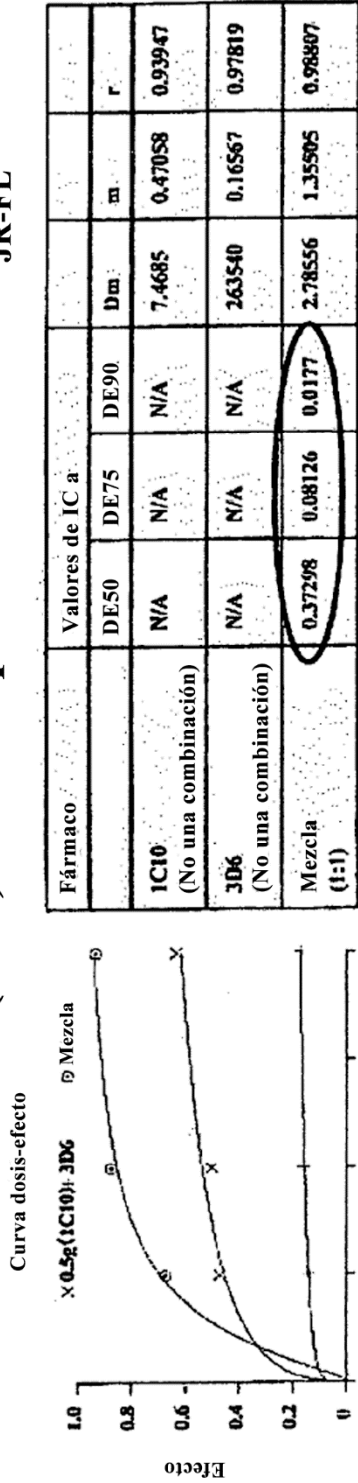


Fig.5

Efectos sinérgicos de 0.5γ(1C10) combinado con 0.5δ(3D6) en la supresión de VIH-1_{JR-FL}



1C10 y 3D6 cubren diferente tropismo de virus y también muestran efecto de sinergia en el mismo virus

Fig. 6

VH de 1C10 Nuc.

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGTTTIGATCCAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
 TCTGGGTTACAGTCACTAGCAGCAGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGAGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
 TCAGTTGTTTATAGCGGTGGGAACACATATAACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAGCATCTCCAGAGAC
 AATTCCAAGAACACGGTATATCTTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGGC
 AGAGATTTAGGGGGGGGACC GGTCCTGACTACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

VL de 1C10 Nuc.

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 GCAAGTGAGAGCATTAAACACCTATTTAAATTGGTATCAACAGAGACCCAGGGAAAGCCCTAAACTCCTGATC
 TATGCTGCATCCACTTTACAAACTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACACTTTTCACT
 CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAGGATCTTGCAACTTATTACTGTCAACAGAGTTTCAGTACCCTCCCG
 TACACTCTTGGCCGGGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGT

VH de 1C10 secuencia de aminoácidos

FR1	CDR1	FR2	CDR2
EVQLVESGGGLIQPGSRLRLSCAASGFTVS	<u>SSSMS</u>	WVRQAPEKGLEWVS	<u>VVYSGGNTYNADSVKG</u>
FR3	CDR3	FR4	
RFSISRDNKNTVYLQMNSLRADDTAVYYCAR	<u>DLGGDRSSDY</u>	WGQGLVTVSS	

VL de 1C10 secuencia de aminoácidos

FR1	CDR1	FR2	CDR2
DIQLTQSPSSLSASVGDRTVITC	<u>RASESINTYLN</u>	WYQRPQKAPKLLIY	<u>AASTLQT</u>
FR3	CDR3	FR4	
GVPSRFSGSGSLFLFLTISLSLQPEDLATYYC	<u>QQSFSTLPYT</u>	LGRGTVKVEIKG	

Fig. 7

VH de 5G2 Nuc.

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCGGCTGGGAACCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
 TCTGGAATCATCTTCAGTACCGCTAATTTACACTGGCTCOGCCACGTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTG
 GCCATTATTTTCATATGATGGCCACAGACAATACTACGCAGACCTCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGA
 GACAATTCGAAGAACCCCTGCATCTGCAATGGACGGCCTGACATCTGACGACACGGCTGTCTATTATTGT
 GCCAAAGACCGGGCAGATGAGAACAATTTAGGTCCGCTTTGACTACTGGGGCCGGGGCACCCCTGGTCACC
 GTCTCTCA

VL de 5G2 Nuc.

GAAATTGTGTTGACCGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTATCAOCAGGGGAAGGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
 GCCAGTCAGAGTATTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATC
 TATGGTGCATCCACCGGGCCACTGGTATCCAGCCAGGTTCCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT
 CTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCGATTTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGTTTACCGATA
 ACCTTCGGCCAAAGGGACACGACTGCAGATTAACGT

VH de 5G2 secuencia de aminoácidos

FR1	CDR1	FR2	
EVQLVESGGGVVRRPGNSLRLSCAASGIIFS	<u>TANLH</u>	WLRHVPKGLEWVA	
CDR2	FR3		CDR3
<u>IISYDGHROYADLVKG</u>	RFTISRDNKNTLHLQMDGLTSDDTAVYYCAK		<u>DGADENNLGPAFDY</u>
FR4			
WGRGTLVTVSS			

VL de 5G2 secuencia de aminoácidos

FR1	CDR1	FR2	CDR2
EIVLTQSPATLSVSPGEGATLSC	<u>RASQSISNLA</u>	WYQQKPGQAPRLLIY	<u>GASTGAT</u>
FR3	CDR3	FR4	
GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAIYYC	<u>QQYGSLPIT</u>	FGGGTRLEIKR	

Fig. 8

VH de 3D6 Nuc.

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGCAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
 TCTGGTTACACTTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCOCTGGACAAGGGCTTCAGTGGATG
 GGATGGATCAGCGCTTACAACGGTAACACTAAGTTTGCACAAGaATTTAAGGGCAGAGTCACCATGACCACA
 GACACATCCGGACCAACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTATTGT
 GCGAGGAGGAATTACTATGATTTCGGGGAGTTATTATATTCGTGACGGGGACTACAGTATGGATGCTCTGGGGC
 CAAGGCACCCTGGTCAOCGTCTCCTCA

VL de 3D6 Nuc.

CAGTCTGTGCTGACTCAGCGCCCTCAGGCTCTGGGACCCCGGGCAGAGGTCACCATCTCTTGTCTGGA
 AGCGGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGGTACCAGCAGTTCCAGGAACGGCCCAAAC?CCTC
 ATCTATAATAATAATCAGCGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCC
 TCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGCGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCTG
 GATGGTGGGTGTTGCGGGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTAGGT

VH de 3D6 secuencia de aminoácidos

FR1	CDR1	FR2	CDR2
EVQLVESAAEVKPKGASVKVSKASGYTFT	<u>SYGIS</u>	WVRQAPGQGLQMMG	<u>WISAYNGNTKFAQ</u>
	FR3	CDR3	FR4
<u>EFKG</u>	RVTMTTDTSAITAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	<u>RNYYSVSGSYIIRDGDYSMDV</u>	WGQGTL

VTVSS

VL de 3D6 secuencia de aminoácidos

FR1	CDR1	FR2	CDR2
QSVLTQPPSASGTPGQRTIISC	<u>SGSGSNIGSNITVN</u>	WYQQFPGTAPKLLIY	<u>NNNQRPVSGVPDRFS</u>
	CDR3	FR4	
<u>GSKSGTSASLAISGLQSADEADYYC</u>	<u>ATWDDSLDGWV</u>	FGGGTKLTVLG	

Fig. 9

VH de 42F9 Nuc.

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGOC
 TCTGGATTCCGCTTTGGTGGATATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAGTGGGT
 TCTGGTATTAAATGGAATGGTGGTAGCACAGGTTATGCAGACTCTGTGCAGGGCCGATTACCCACCTCCAGA
 GACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT
 GCGAGAGATGAGAATTACGATATTTTACTGGTAACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC
 ACGGTCACCGTCTCCTC

VL de 42F9 Nuc.

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCGG
 GCAAGTCAGAGCATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATC
 TATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTAGTGCCAGTGGATCTGGGACAGATTCACT
 CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTCTACTGTCAAACAGAGTACAGATATCCOCTAC
 ACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGT

VH de 42F9 secuencia de aminoácidos

FR1	CDR1	FR2	CDR2
EVQLVESGGGVVRRPGSSLRLSCAASGFAPG	<u>EYQMS</u>	WVRQAPGKGLEWVS	<u>GINWNGG</u>
	FR3		CDR3
<u>STGYADSVQG</u>	RFTTSRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTALYICAR	<u>DENYDILTGNYYYGM</u>	
FR4			
<u>DV</u> WGQGTITVTVSS			

VL de 42F9 secuencia de aminoácidos

FR1	CDR1	FR2	CDR2
DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC	<u>RASQSI SNYLN</u>	WYQOKPGKAPKLLIY	<u>AASSLOS</u>
	FR3	CDR3	FR4
<u>GVPSRFSGSGSDFTLTFTISSLPEDFATFYC</u>	<u>QQSHSIPYT</u>	<u>FGQGTKLEIKR</u>	

Fig. 10

VH de 49G2 Nuc.

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
 TCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
 GGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGG
 GACACGTCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
 GCGAGAGGACCTATAGCAGCAGCAACCCATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCT
 TCA

VL de 49G2 Nuc.

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTGTCTGGA
 AGCGGCTCCAACATCGGAAGTAATACGTAAACTGGTACCAGCAGTTCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTC
 ATCTATAATAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCC
 TCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGCGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCTG
 gATGGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTAGGT

VH de 49G2 secuencia de aminoácidos

FR1	CDR1	FR2	CDR2
EVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSKASGYTFT	<u>GYMH</u>	WVRQAPGQGLEWMG	<u>WINPNSG</u>
	FR3		CDR3
<u>GTNYAQKFG</u>	RVTMTRDTSISSTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR	<u>GPLAAATHAFDI</u>	WG
FR4			
QGTMTVSS			

VL de 49G2 secuencia de aminoácidos

FR1	CDR1	FR2	CDR2
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	<u>SGSGSNIGSNTVN</u>	WYQDFPGTAPKLLIY	<u>NNNQRP</u>
	FR3	CDR3	FR4
<u>S</u>	GVPDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSADEADYYC	<u>ATWDDSLDQWV</u>	FGGGTKLTVLG

Fig.11

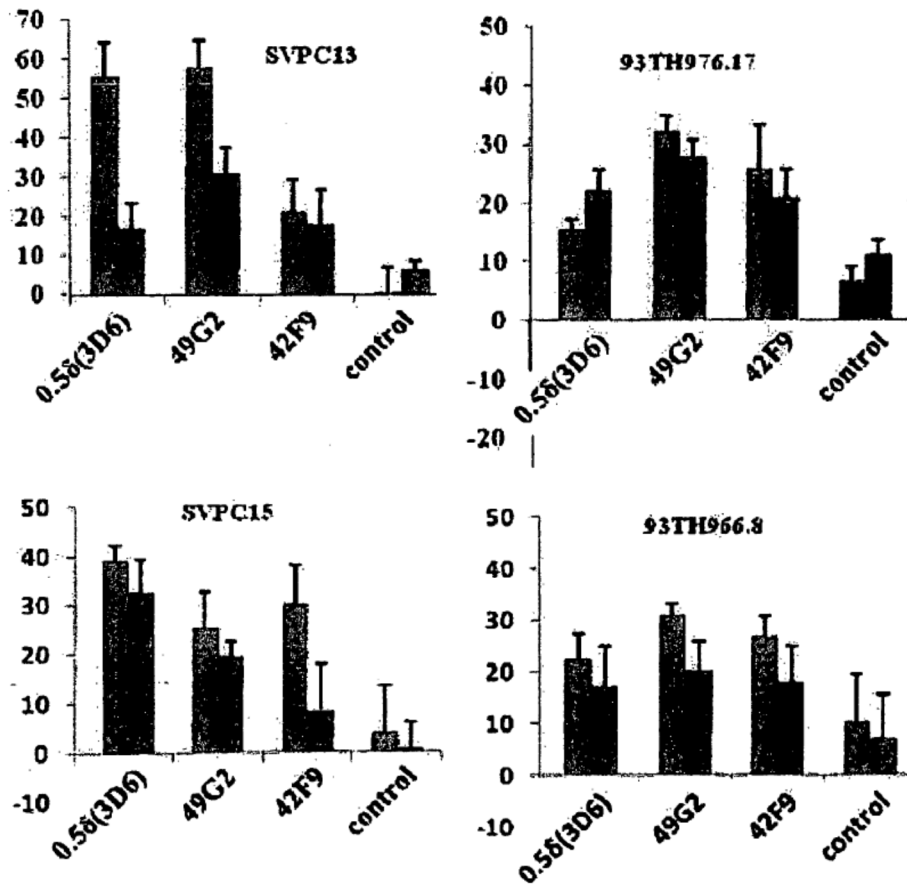
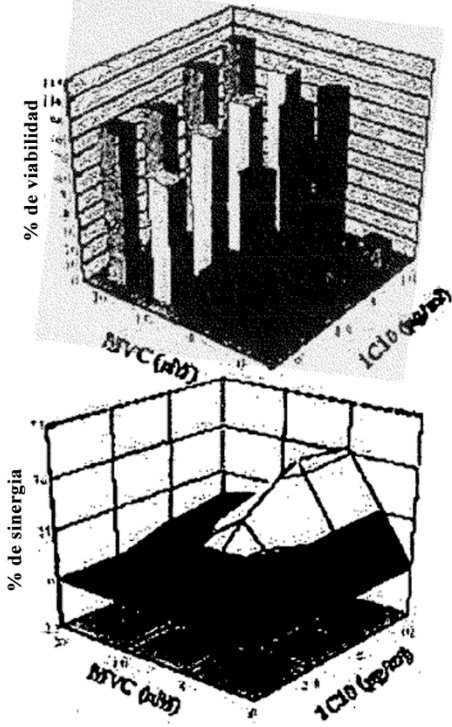


Fig.12

Sinergia de MVC con 1C10



Sinergia de MVC con 5G2 (JR-FL)

