

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 892**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2011 PCT/EP2011/000728**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11101122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2011 E 11704189 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2536758**

54 Título: **Anticuerpos anti-E7 del HPV**

30 Prioridad:

30.09.2010 EP 10011978

16.02.2010 EP 10001569

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

16.05.2019

73 Titular/es:

**ÖSTERREICHISCHE AKADEMIE DER
WISSENSCHAFTEN (50.0%)**

Dr. Ignaz Seipel-Platz 2

1010 Wien, AT y

AUSTRIA WIRTSCHAFTSSERVICE

GESELLSCHAFT MBH (50.0%)

72 Inventor/es:

JANSEN-DÜRR, PIDDER;

ZWERSCHKE, WERNER;

PIRCHER, HAYMO;

EHEHALT, DANIELA;

LENER, BARBARA y

DREIER, KERSTIN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 712 892 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-E7 del HPV

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-E7 del HPV (papilomavirus humano) capaces de reconocer específicamente un epítipo de la región N terminal de una proteína E7 del HPV 18, a composiciones y a kits diagnósticos que comprenden dichos anticuerpos, así como a procedimientos para el diagnóstico con una base inmunohistoquímica y de ELISA de las infecciones por HPV utilizando dichos anticuerpos.

Las infecciones de transmisión sexual por papilomavirus humanos (HPV) son el principal factor etiológico del cáncer cervicouterino. Se han descrito más de cuarenta, en particular más de treinta y cinco genotipos del HPV, que pueden infectar las células del epitelio pavimentoso y glandular de la mucosa cervicouterina. Sobre la base de los datos epidemiológicos y bioquímicos, los HPV de ADN bicatenario se dividen en HPV de alto riesgo asociados con lesiones intraepiteliales pavimentosas con un elevado potencial de progresión hacia un carcinoma epidermoide invasivo, y HPV de bajo riesgo asociados con una hiperplasia benigna. Se han detectado infecciones por los genotipos de alto riesgo en prácticamente todas las lesiones neoplásicas del cuello del útero, y al menos 15 tipos de HPV de alto riesgo están asociados con el cáncer cervicouterino. El HPV 16 es el más genotipo prevalente en todo el mundo, con una incidencia del carcinoma epidermoide de aproximadamente el 55 %, seguido del HPV 18 (de aproximadamente el 17 %) y del HPV 45 (del 4-9 %).

La persistencia del HPV oncogénico es necesaria para el desarrollo del precáncer y del cáncer cervicouterino. Sin embargo, los factores que determinan la persistencia vírica y la progresión oncogénica no se comprenden en su totalidad. Los acontecimientos iniciales de la carcinogénesis cervicouterina después de una infección vírica dependen del hecho de que los tipos del HPV de alto riesgo experimenten unos cambios específicos que anulan el control de la transcripción de la expresión génica vírica en los queratinocitos infectados. La inactivación de estas funciones de control celular permite una transcripción desregulada de los genes víricos tempranos E6 y E7, desencadenando así la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, la reprogramación de la diferenciación y la inestabilidad cromosómica. Estos cambios pueden dar apoyo a la integración episómica de los genomas del HPV en los cromosomas de la célula hospedadora y contribuir a una sobreexpresión adicional de los genes víricos E6 y E7, dando como resultado un aumento en los niveles de la oncoproteína E7 durante las etapas tempranas de la carcinogénesis cervicouterina.

El hecho de que las oncoproteínas víricas E6 y E7 son cruciales durante la carcinogénesis se comprobó adicionalmente por el hecho de que la proteína E7 de alto riesgo, en cooperación con la E6 de alto riesgo, puede inmortalizar eficazmente los queratinocitos primarios humanos *in vitro*. Además, es necesaria la coherente sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7 para inducir y mantener el fenotipo transformado de las células de cáncer cervicouterino.

Por lo tanto, la sobreexpresión de las oncoproteínas E7 de los tipos carcinógenos del HPV es un rasgo característico del cáncer cervicouterino. Esta conclusión está apoyada por un estudio reciente en el que se usaron anticuerpos purificados por afinidad contra las proteínas E7 del HPV de alto riesgo para detectar las oncoproteínas E7 del HPV 16, del 18 y del 45 en biopsias de pacientes con un carcinoma epidermoide cervicouterino invasivo (Ressler et al., 2007, Clin Cancer Res, 13: 7067-7072), lo que indica que las oncoproteínas E7 de alto riesgo de estos principales tipos del HPV de alto riesgo son expresadas de forma continua en el carcinoma cervicouterino invasivo.

Actualmente, el cribado clínico del cáncer cervicouterino se basa fundamentalmente en la evaluación citológica de las células contenidas en frotis cervicouterinos, denominada citología cervicouterina (o prueba de Papanicolaou; Papanicolaou, 1942, Science, 95: 438-439), que se obtienen de forma rutinaria a partir de las mujeres que participan en programas de cribado. El resultado de los análisis citológicos depende de la detección de células anormales por parte de patólogos experimentados. Aunque la implementación de este simple y eficaz ensayo ha ayudado a reducir considerablemente la mortalidad por el cáncer cervicouterino, el diagnóstico citológico cervicouterino se caracteriza todavía por un elevado índice de resultados falsos positivos y falsos negativos (Foucar, 2005, Semin Diagn Pathol, 22 (2): 147-155).

En una metodología alternativa, se ha introducido la detección del ADN del HPV de alto riesgo en la práctica clínica. En estas condiciones se aplica un ensayo de detección de ADN sensible (por ejemplo, Hybrid capture 2TM; Digene Inc., Estados Unidos) para determinar la presencia del ADN del HPV de alto riesgo en las muestras de un paciente. Aunque este ensayo es idóneo para la detección de infecciones por papilomavirus del tipo de alto riesgo, no puede discriminar entre infecciones temporales, que remiten espontáneamente en la mayoría de los casos, y la aparición de un cáncer cervicouterino. Más recientemente se han desarrollado sistemas diagnósticos que detectan la presencia del ARNm de E6/E7 en frotis cervicouterinos, como un marcador indirecto de la expresión de las oncoproteínas víricas E6 y E7. Sin embargo, se ha demostrado que el nivel de ARNm de E6/E7 no cambia significativamente durante la progresión del carcinoma, lo que sugiere que la detección del ARN puede no ser la mejor herramienta para el cribado del cáncer cervicouterino (Hafner et al., 2008, Oncogene, 27 (11): 1610-1617). Según esta noción, la infección subyacente por el HPV podría no ser detectada mediante un análisis de PCR en todos los tumores analizados por Ressler et al., 2007.

Por lo tanto, la detección de la proteína E7 parece ser la herramienta diagnóstica superior. En la materia ya se conocen diversos anticuerpos, pero o bien muestran una baja sensibilidad o especificidad, o bien se ha descrito que presentan una reacción cruzada con las proteínas E7 de varios tipos de HPV. También, dado que los anticuerpos policlonales solo pueden ser producidos en una cantidad limitada por un animal, existen diferencias entre los lotes.

5 La dificultad para producir anticuerpos monoclonales muy específicos y sensibles contra las proteínas E7 se debe fundamentalmente a la baja inmunogenicidad de las proteínas E7.

El documento WO 07/059492, por ejemplo, desvela procedimientos, ensayos y kits para la detección del ADN o de las proteínas del HPV, que emplea, entre otros, anticuerpos monoclonales y policlonales contra la proteína E7 del HPV 16, capaces de detectar de forma fiable la más bien alta cantidad de alrededor de 1 µg de la proteína E7 recombinante del HPV 16.

10

El documento WO 05/026731 desvela anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente contra la E7 del HPV 18 que no muestran reactividad cruzada con las proteínas E7 de la E7 del HPV 16, pero una sensibilidad significativamente menor contra la E7 del HPV 18 en comparación con los anticuerpos policlonales.

El documento WO 06/085822 se refiere a la expresión de segmentos definidos de las oncoproteínas E7 del HPV 16 y 18 en un fago para su uso como inmunógenos, con objeto de establecer anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón. Sin embargo, los ejemplos muestran únicamente anticuerpos contra la E7 del HPV 16.

15

Consecuentemente, el problema técnico subyacente en la presente invención es superar las dificultades mencionadas anteriormente y proporcionar un medio muy específico y más sensible para un diagnóstico rentable, rápido y fiable de las infecciones de alto riesgo por el HPV.

La presente invención resuelve su problema subyacente según las enseñanzas de las reivindicaciones independientes. Consecuentemente, la presente invención proporciona una línea celular de hibridoma, que tiene el número de acceso DSM ACC3035 y un anticuerpo monoclonal, obtenible a partir del sobrenadante de la línea celular de hibridoma, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal anti-E7 del HPV, que es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región N terminal de la proteína E7 del HPV 18, en el que el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID nº 5 u 8.

20

25

El término "anticuerpo", según se emplea en el presente documento, se refiere preferentemente a una inmunoglobulina completa, como una IgG, una IgA, una IgM, una IgD o una IgE, pero en otra realización también puede referirse a un fragmento de un anticuerpo, como un F(ab), un F(abc), un Fv, un Fc o un F(ab)₂ o un anticuerpo fusionado, un fragmento de anticuerpo fusionado u otro derivado del anticuerpo de la presente invención, siempre que todavía muestre la especificidad y la sensibilidad de la inmunoglobulina completa de la presente invención.

30

Se entiende que el término "especificidad" o "que reconoce/se une específicamente" se refiere a la propiedad de un anticuerpo de reconocer o unirse específicamente preferentemente únicamente a un epítipo específico, y preferentemente no muestra o no muestra sustancialmente una reactividad cruzada con otro epítipo. Preferiblemente "especificidad" o "que reconoce/se une específicamente" significa que el anticuerpo reconoce o se une específicamente preferentemente únicamente a un epítipo específico, y preferentemente no muestra o no muestra sustancialmente una reactividad cruzada con otro epítipo, en el que dicho epítipo es único para una proteína, de forma que el anticuerpo no muestra o no muestra sustancialmente una reactividad cruzada con otro epítipo ni con otra proteína.

35

El término "sensibilidad", según se emplea en el presente documento, se refiere al límite de detección de un anticuerpo, que preferentemente es bajo, es decir, al menos por debajo de una concentración de 1 µg de la proteína que va a ser detectada.

40

En general, el término "epítipo" se refiere a una región antigénica de una proteína dada que consiste en entre 4 y 50, preferentemente en entre 5 y 15, preferentemente en entre 8 y 11 aminoácidos, o más. Esta región antigénica o epítipo es reconocida específicamente por el (los) sitio(s) de unión al antígeno del anticuerpo.

En el contexto de la presente descripción, se entiende que el término "región C terminal" se refiere como mucho a los 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 aminoácidos C terminales de la proteína E7 del HPV.

45

La presente descripción también desvela un anticuerpo monoclonal anti-E7 del HPV que reconoce específicamente un epítipo del dominio en dedo de cinc de la región C terminal de la proteína E7 del HPV, preferentemente dicho epítipo es un epítipo conformacional.

Los anticuerpos monoclonales según la presente invención se usan preferentemente para la detección de las proteínas E7 del HPV nativas, es decir, no desnaturalizadas.

50

En el contexto de la presente descripción, el término "epítipo conformacional" se refiere a un epítipo tridimensional que el anticuerpo reconoce o al que se une específicamente por oposición a un epítipo lineal. Los epítipos lineales están determinados únicamente por la secuencia de aminoácidos, mientras que los epítipos conformacionales están determinados por las características de la superficie tridimensional, es decir, la estructura terciaria. Por lo tanto, los

55

aminoácidos de un epítipo conformacional que definen la antigenicidad de una proteína no tienen por qué ser necesariamente los aminoácidos consecutivos de la proteína, sino que pueden estar distantes entre sí en la secuencia primaria de la proteína para formar el epítipo conformacional, únicamente si la proteína está plegada en su estructura terciaria. Sobre todo, dichos epítipos conformacionales no pueden ser reconocidos por el anticuerpo, si la proteína está desnaturalizada, es decir, no está plegada en su estructura terciaria.

Las proteínas E7 del HPV contienen un dominio en dedo de cinc en su parte C terminal, que forma una estructura rígida muy ordenada, debido fundamentalmente a 4 residuos de cisteína. Estos residuos de cisteína se coordinan con el cinc y representan por lo tanto un epítipo conformacional. Sorprendentemente, se ha averiguado que los anticuerpos monoclonales que son capaces de reconocer o de unirse a dicho epítipo conformacional, son capaces de detectar una proteína E7 del HPV de una forma muy específica y muy sensible.

El anticuerpo monoclonal divulgado es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región C terminal, preferentemente el dominio en dedo de cinc, de la proteína E7 de los subtipos del HPV 16, en particular de los tipos del HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58 o de los subtipos del HPV 18, en particular de los tipos del HPV 18, 39, 45, 59, 68, 70 o de ambos subtipos del HPV 16 y del 18. Preferiblemente, el epítipo reconocido es un epítipo conformacional. Preferiblemente, el epítipo reconocido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID n° 1 (no según la presente invención) que es un motivo de la secuencia del epítipo común presente en los epítipos desvelados. El motivo del epítipo caracterizado por la SEQ ID n° 1 representa un motivo de epítipo consenso para los subtipos del HPV 16 y 18, y es: Val Cys Pro Xaa Cys, siendo Xaa cualquier aminoácido.

El término "motivo de epítipo consenso" según se emplea en el presente documento se refiere a las partes específicas de un epítipo que son compartidas por las proteínas E7 del HPV de los subtipos 16 y/o 18. A pesar de compartir dicho motivo de epítipo consenso, las regiones C terminales de los subtipos del HPV 16 y/o 18, en particular los epítipos específicos contenidos en las mismas y que contienen este motivo de epítipo son, debido a las secuencias específicas de aminoácidos y/o a una conformación específica de la secuencia de aminoácidos, sustancialmente lo suficientemente diferentes, de forma que los anticuerpos específicos son capaces de reconocer específicamente una proteína E7 en particular de un tipo específico de HPV, es decir, son capaces de identificar específicamente un tipo de HPV en particular.

El anticuerpo monoclonal divulgado es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región C terminal, preferentemente el dominio en dedo de cinc, de los subtipos del HPV 16, en particular del 16, del 31, del 33, del 35, del 52 y del 58. Preferiblemente, el epítipo reconocido es un epítipo conformacional. Preferiblemente, el epítipo reconocido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID n° 2, que es un motivo de secuencia común presente en los epítipos de los subtipos del HPV 16. El motivo del epítipo caracterizado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n° 2 representa un motivo de epítipo consenso específico para los subtipos del HPV 16 y es: Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Val Cys Pro Xaa Cys, siendo Xaa cualquier aminoácido.

El anticuerpo monoclonal divulgado es capaz de reconocer específicamente la proteína E7 del HPV 16. Preferiblemente, el epítipo reconocido comprende, preferentemente consiste en, la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID n° 3. El epítipo caracterizado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n° 3 representa un epítipo conformacional específico del dominio en dedo de cinc en la parte C terminal de la proteína E7 del HPV 16 y es: Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys. Estos aminoácidos representan las posiciones 85 hasta 97 de la proteína E7 del HPV 16. El epítipo conformacional está representado adicionalmente por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n° 7 y es: Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro. Estos aminoácidos representan las posiciones 86 hasta 98 de la proteína E7 del HPV 16. La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n° 6 representa un epítipo conformacional específico de la SEQ ID n° 3 y 7 y es: Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys. Estos aminoácidos representan las posiciones 86 hasta 97 de la proteína E7 del HPV 16. Todas estas secuencias de epítipos comprenden dos de los cuatro residuos de cisteína que coordinan el ion de cinc con el dominio en dedo de cinc en dos motivos CXXC. El cartografiado de epítipos usando micromatrices con péptidos de 13 mer sintéticos derivados de la E7 del HPV 16 identificaron este epítipo para que fuera reconocido por el anticuerpo monoclonal divulgado de una forma muy específica (véase la figura 10). Una alineación de las secuencias de la E7 del HPV sugirió que especialmente los aminoácidos secuencia arriba y secuencia abajo del motivo muy conservado 90VCPXC94 del epítipo de la SEQ ID n° 3, 6 y 7 proporcionan el reconocimiento específico de la proteína E7 del HPV 16 por parte del anticuerpo monoclonal divulgado.

Un análisis mutacional demostró que los péptidos que contenían una mutación puntual en el sitio de coordinación del cinc no podían ser detectados por el anticuerpo monoclonal contra la proteína E7 del HPV 16, mientras que los mutantes de delección de otras regiones podían ser detectados fácilmente. Esto indica claramente que un dominio en dedo de cinc intacto, que representa un epítipo conformacional, es necesario para el reconocimiento específico de la proteína E7 del HPV 16 por parte del anticuerpo monoclonal divulgado. Esto está mejor ilustrado por la incapacidad del anticuerpo monoclonal divulgado contra la E7 del HPV 16 para reconocer la E7 del HPV 16 mutante C58G, en la que el residuo de cisteína de la posición 58 está cambiado por glicina, que contiene la secuencia necesaria para el reconocimiento del epítipo lineal, pero ha perdido la capacidad para proporcionar a este epítipo un dominio en dedo de cinc conformacional.

Según la naturaleza conformacional del epítipo de la SEQ ID n° 3 y 7, en particular de la SEQ ID n° 6, el anticuerpo

monoclonal que reconoce este epítipo debe ser usado a unas concentraciones mucho mayores (por ejemplo, de 15 µg/ml para detectar 10 ng de proteína purificada) en aplicaciones como una inmunotransferencia Western o el reconocimiento de la proteína en lisados celulares, en los que las proteínas están desnaturalizadas, que los anticuerpos policlonales conocidos contra la E7 del HPV 16.

5 Este epítipo, preferentemente el epítipo conformacional C terminal, está en una región de la proteína E7 que habitualmente muestra una baja inmunogenicidad. Sorprendentemente, podría demostrarse que el anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo según se proporciona en la SEQ ID nº 3 y 7, en particular en la SEQ ID nº 6, es capaz de detectar específicamente la proteína E7 del HPV 16 de una forma muy sensible y no presenta reactividad cruzada con las proteínas E7 de otros tipos de HPV, preferentemente en unas aplicaciones no desnaturalizantes. En particular, el anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16 presenta reactividad cruzada con las proteínas E7 del HPV 18 o del HPV 45, cuando estas proteínas estaban sobreexpresadas en células U-2OS. También, el anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16 detectaba fuertemente las células CaSki positivas para la proteína endógena E7 del HPV 16 en experimentos de inmunofluorescencia. Por el contrario, no se observó ninguna señal en células U-2OS no transfectadas o en células HeLa positivas para el HPV 18. Para caracterizar de forma más precisa la reacción cruzada del anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16, se empleó un ensayo de ELISA usando las proteínas E7 de diferentes tipos de HPV. Tampoco se encontró ninguna reactividad cruzada contra las proteínas E7 de otros tipos de HPV, tales como otros genotipos del HPV de alto riesgo y los dos tipos más habituales de bajo riesgo del HPV, el HPV 6 y el HPV 11.

Además, la preincubación del anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16 con la proteína purificada E7 del HPV 16 impidió la detección de la E7 del HPV 16 asociada a la célula, dado que el anticuerpo ya estaba unido específicamente a la proteína E7 del HPV 16 preincubada.

En comparación con la técnica anterior, el anticuerpo monoclonal divulgado es al menos 20 veces, en particular al menos 100 veces, más sensible, sin ninguna pérdida de especificidad. Dado que las infecciones por el HPV 16 suponen más del 50 % de los casos de carcinoma cervicouterino en todo el mundo, el anticuerpo altamente específico es adecuado para que sirva como una herramienta diagnóstica muy eficaz y fiable. Ventajosamente, podría demostrarse que el anticuerpo monoclonal divulgado anti-E7 del HPV 16 es capaz de detectar unas cantidades tan bajas tales como de 1 pg, en particular de 500 fg, de la proteína E7 del HPV 16, en un ensayo de basado en un ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática), mientras que los anticuerpos divulgados en el documento WO 07/059492 solo podrían detectar unas concentraciones de la proteína E7 del HPV 16 de aproximadamente 1 µg. El anticuerpo monoclonal anti-E7 del HPV 16 divulgado puede usarse por lo tanto a unas concentraciones mucho menores, por ejemplo, de 10 pg/µl, lo que hace que su aplicación como una herramienta diagnóstica sea también más rentable.

Mediante el uso del anticuerpo monoclonal divulgado contra la E7 del HPV 16 también podría demostrarse que la localización subcelular de la proteína E7 del HPV 16 varía durante el ciclo celular entre predominantemente citoplasmática y predominantemente nuclear.

Se ha demostrado que los niveles de la proteína E7 aumentan desde unos niveles indetectables hasta sustanciales durante la carcinogénesis. Con los anticuerpos monoclonales altamente sensibles según la invención es posible detectar no solamente las células tumorales del carcinoma epidermoide y de adenocarcinomas, sino también las células de neoplasia intraepitelial cervicouterina precancerosa de gran malignidad y del carcinoma *in situ* (CIN III y CIS), así como las de la neoplasia glandular intraepitelial cervicouterina de grado III y del adenocarcinoma *in situ* (CIGN III y AIS), de las que se notificó que tenían un alto potencial de progresar hacia un cáncer invasivo. Esto podría permitir ventajosamente un diagnóstico temprano de los CIN III, CIS, CIGN III, ACIS y AIS precancerosos de gran malignidad antes de su progresión a tumores malignos, ya que los anticuerpos monoclonales según la presente invención pueden discriminar entre lesiones precancerosas de poca malignidad de las células epidermoides y de origen glandular (CIN I-II, CIGN I-II), por un lado, y precánceres (CIN III, CIS, CIGN III) y cánceres (CxCa, AdCa) de gran malignidad de las células epidermoides y de origen glandular, por otro lado. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales según la presente invención pueden servir como una nueva herramienta para identificar precánceres y cánceres de gran malignidad de las células epidermoides y de origen glandular.

Por lo tanto, la presente descripción desvela un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID nº 1, 2, 3 y 4, preferentemente que comprende o que consiste en la SEQ ID nº 3 y 7, en particular en la SEQ ID nº 6.

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal divulgado que es capaz de reconocer específicamente la proteína E7 del HPV 16, preferentemente capaz de reconocer un epítipo con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID nº 3 y 7, en particular de la SEQ ID nº 6, comprende, preferentemente consiste en, una cadena pesada que tiene la secuencia de ADNc de la SEQ ID nº 9 o una cadena ligera que tiene la secuencia de ADNc de la SEQ ID nº 10, o ambas.

Por lo tanto, la presente descripción desvela un anticuerpo monoclonal o un fragmento de la misma, en la que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos codificada por al menos una de la SEQ ID nº 9 o 10. Esto también engloba las versiones mutadas de la SEQ ID nº 9 o 10, es decir, las secuencias que comprenden adiciones, deleciones y/o sustituciones de nucleótidos individuales o múltiples en comparación con la

SEQ ID nº 9 o 10 siempre que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo codificado por la secuencia mutada todavía muestre la especificidad y la sensibilidad de la inmunoglobulina completa.

La presente descripción también desvela una línea celular de hibridoma, preferentemente una línea celular de hibridoma de un mamífero, lo más preferido de conejo, capaz de producir el anteriormente identificado anticuerpo monoclonal, en particular el anticuerpo capaz de reconocer específicamente la proteína E7 del HPV 16, preferentemente capaz de reconocer un epítipo de la región C terminal del HPV 16, en particular un epítipo conformacional, preferentemente un epítipo con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID nº 3 y 7, en particular de la SEQ ID nº 6. La línea celular de hibridoma tiene el número de acceso DSM ACC 3034. La presente descripción también desvela el anticuerpo monoclonal, que es obtenible a partir del sobrenadante de una línea celular de hibridoma.

El término "línea celular de hibridoma" según se emplea en el presente documento se refiere a una línea celular obtenida mediante la fusión de células de mieloma, preferentemente de células linfoides inmortalizadas de mamífero, en particular de conejo, con los linfocitos B del bazo de un mamífero, preferentemente de un conejo que ha sido inmunizado con el antígeno deseado, es decir, una proteína purificada E7 del HPV. Dicha línea celular inmortal de hibridoma es capaz de producir un tipo de anticuerpo específico y definido que es secretado en el medio de cultivo celular o en el sobrenadante. El término "monoclonal" se refiere a la línea celular a partir de la cual se obtiene el anticuerpo, en la que todas las células son clones de una única célula parental. Esto permite ventajosamente unos procedimientos de producción y de purificación estandarizados para obtener anticuerpos monoclonales de la misma calidad.

Adicionalmente, dichas líneas celulares de hibridoma pueden ser cultivadas indefinidamente en el medio de cultivo celular adecuado, proporcionando así una fuente infinita del anticuerpo monoclonal, sin variaciones entre los lotes. Esto es particularmente ventajoso para una aplicación de anticuerpos monoclonales en rutinas de diagnóstico clínico, ya que pueden omitirse las largas pruebas de nuevos lotes de anticuerpos y los procedimientos diagnósticos pueden producir unos resultados constantes y fiables.

El anticuerpo monoclonal divulgado es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región C terminal, preferentemente el dominio en dedo de cinc, de los subtipos del HPV 18, en particular del 18, del 39, del 45, del 59, del 68 y del 70. Preferiblemente, el epítipo reconocido es un epítipo conformacional. Preferiblemente, el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID nº 4 (no según la presente invención), que es un motivo de secuencia común presente en los epítipos de los subtipos del HPV 18 y es: Phe Val Cys Pro Xaa Cys Ala Xaa Xaa Gln, siendo Xaa cualquier aminoácido.

El motivo de epítipo caracterizado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID nº 4 (no según la presente invención) representa un motivo de epítipo consenso de los subtipos del HPV 18.

En otro aspecto, la presente descripción desvela un anticuerpo monoclonal anti-E7 del HPV, que es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región N terminal de una proteína E7 del papilomavirus humano. Este anticuerpo monoclonal divulgado es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región N terminal de la proteína E7 de los subtipos del HPV 16, en particular de los tipos del HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58 o de los subtipos del HPV 18, en particular de los tipos del HPV 18, 39, 45, 59, 68, 70, o de ambos subtipos del HPV 16 y 18.

El término "región N terminal" según se emplea en el presente documento se refiere a los aminoácidos 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 más N terminales de la proteína E7 del HPV.

En una realización, el anticuerpo monoclonal reconoce específicamente un epítipo de la región N terminal de la proteína E7 de los subtipos del HPV 18, en particular de los tipos del HPV 18, 39, 45, 59, 68, 70, preferentemente del HPV 18, del HPV 45 o de ambos. Preferiblemente, el anticuerpo que reconoce específicamente la región N terminal de la proteína E7 del HPV 18 muestra una reactividad cruzada con el HPV 11, 45, 56, 58, 59 y 70. En particular, el anticuerpo que reconoce específicamente la región N terminal de la proteína E7 del HPV 18 muestra un alto nivel de reactividad cruzada con el HPV 18, 45 y 56, un nivel intermedio de reactividad cruzada con el HPV 6 y 39 y un bajo nivel de reactividad cruzada con el HPV 11, 33, 52, 58 y 59 con las respectivas proteínas E7 sobreexpresadas de forma temporal por las células U-2OS en un ensayo de inmunofluorescencia. En un ensayo basado en un ELISA, sin embargo, podría demostrarse que el anticuerpo monoclonal según la presente invención, que es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región N terminal de la proteína E7 del HPV 18, únicamente presenta una reactividad cruzada sustancialmente con la proteína E7 del HPV 45. También, el anticuerpo monoclonal según la presente invención, capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región N terminal, era capaz de detectar fuertemente la proteína endógena E7 de las células HeLa positivas para el HPV 18, mientras que no se obtuvo ninguna señal en las células U-2OS no transfectadas o en las células CaSki positivas para el HPV 16, tanto en experimentos de inmunofluorescencia como de inmunotransferencia western.

El epítipo específico N terminal reconocido comprende, preferentemente consiste en, la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID nº 5 y es: Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu. Estos aminoácidos representan las posiciones 5 hasta 13 de la proteína E7 del HPV 18. Una realización adicional del epítipo N terminal está representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID nº 8 y es: Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu.

Estos aminoácidos representan las posiciones 4 hasta 13 de la proteína E7 del HPV 18.

Ventajosamente, podría demostrarse que el anticuerpo monoclonal anti-E7 del HPV 18 según la presente invención es capaz de detectar unas cantidades tan bajas tales como de 1 pg, en particular de 500 fg, de la proteína E7 del HPV 18 en un ensayo basado en un ELISA.

5 La presente invención también se refiere a una línea celular de hibridoma, preferentemente a una línea celular de hibridoma de mamífero, lo más preferido de conejo, capaz de producir el anticuerpo monoclonal capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región N terminal de la proteína E7 del HPV 18, capaz de reconocer un epítipo con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID nº 5 o 8. La presente invención se refiere a la línea celular de hibridoma, que tiene el número de acceso DSM ACC 3035. La presente invención también se refiere al anticuerpo monoclonal, que es obtenible a partir del sobrenadante de una línea celular de hibridoma según la presente invención.

10 Los anticuerpos monoclonales según la presente invención son anticuerpos monoclonales de mamífero, preferentemente de conejo (RabMabs), preferentemente producidos por una línea celular de hibridoma de conejo. Debido a un sistema inmunitario más sofisticado, los conejos son capaces de producir anticuerpos más elaborados que los ratones. Esta ventaja, combinada con la posibilidad de crear líneas celulares de hibridoma de conejo, hace posible la obtención de anticuerpos monoclonales de alta calidad.

15 Para diversas aplicaciones, los anticuerpos monoclonales según la presente invención pueden ser marcados por sí mismos de una forma detectable con un grupo radioactivo, enzimático o fluorescente. Hay disponible una diversidad de técnicas para el marcaje de biomoléculas tales como anticuerpos, que son bien conocidas por la persona experta en la materia. Los marcadores usados habitualmente comprenden, entre otros, fluorocromos, como fluoresceína, rodamina, Texas Red, Cy3 o Cy5, enzimas como peroxidasa, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina o acetilcolinesterasa, isótopos radioactivos, digoxigenina, metales coloidales, compuestos quimio-
20 o bioluminiscentes. Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales según la presente invención están marcados con biotina. En otra realización preferida, los anticuerpos de la presente invención son detectados mediante procedimientos secundarios, como una inmunofluorescencia indirecta. Consecuentemente, los anticuerpos secundarios marcados de una forma detectable pueden ser empleados para detectar específicamente los anticuerpos monoclonales según la presente invención.

25 La presente invención también se refiere a una composición diagnóstica que comprende los anticuerpos monoclonales según la presente invención como agente activo. Dicha composición diagnóstica puede comprender, en una realización preferida, el anticuerpo monoclonal de la presente invención en una forma soluble o en una fase líquida. En otra realización preferida, los presentes anticuerpos están unidos, fijados y/o conectados a un soporte sólido. En otra realización preferida, la presente composición diagnóstica comprende los anticuerpos monoclonales según la invención formulados con un portador, un diluyente, un tampón o una solución de conservación diagnósticamente aceptable. La composición diagnóstica de la presente invención comprende, en una realización preferida, los anticuerpos monoclonales individualmente o en combinaciones, según las necesidades de la aplicación prevista. Preferiblemente, dicha composición diagnóstica se usa para la detección inmunológica, preferentemente inmunohistológica, de inmunofluorescencia o basada en un ELISA, de la proteína E7 del HPV en una muestra biológica, para permitir el diagnóstico de infecciones por el HPV.

30 La presente invención también se refiere a un kit diagnóstico que comprende los anticuerpos monoclonales según la invención como primer agente y otros anticuerpos dirigidos contra las proteínas E7 del HPV como segundo agente. Los anticuerpos usados como segundo agente son preferentemente anticuerpos policlonales de cabra, capaces de reconocer las proteínas E7 de los HPV de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 y 59.

El kit diagnóstico de la presente invención comprende, en una realización preferida, los anticuerpos monoclonales individualmente o en combinaciones según las necesidades de la aplicación prevista.

45 El kit diagnóstico según la presente invención se usa preferentemente para la detección inmunológica, preferentemente inmunohistológica, de inmunofluorescencia o basada en un ELISA, de la proteína E7 del HPV, permitiendo así el diagnóstico de infecciones por el HPV. Preferiblemente, el kit diagnóstico de la presente invención comprende adicionalmente opcionalmente uno o más tampones, soluciones de conservación y/u otros reactivos o materiales necesarios con fines médicos, científicos o diagnósticos. Adicionalmente, las partes del kit diagnóstico puede ser envasadas individualmente en viales o en frascos, o en combinación en recipientes o en unidades multirrecipiente.

50 El uso de los anticuerpos monoclonales según la presente invención en un procedimiento *in vitro*, en particular en un procedimiento *in vitro* inmunológico, preferentemente inmunohistoquímico o basado en inmunofluorescencia o en un procedimiento *in vitro* basado en un ELISA, preferentemente en un ELISA directo o en sándwich, también está contemplado por la presente invención. También, los anticuerpos monoclonales según la presente invención podrían usarse ventajosamente en una tira reactiva, por ejemplo, en una prueba de flujo lateral, para la detección de las proteínas E7 del HPV.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la detección de la proteína E7 del HPV

18, que comprende i) la incubación de una muestra biológica con el anticuerpo monoclonal según la presente invención y ii) la medición y/o la detección de la proteína E7 del HPV 18 en la muestra biológica mediante la medición y/o la detección del anticuerpo unido específicamente a la proteína E7.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico inmunológico, preferentemente inmunohistoquímico o basado en inmunofluorescencia, de infecciones por el HPV 18, que comprende a) la incubación de una muestra biológica con los anticuerpos monoclonales según la presente invención y b) la medición y/o la detección de la proteína E7 del HPV 18 en la muestra biológica mediante la medición y/o la detección del anticuerpo unido específicamente a la proteína E7, y permitiendo así el diagnóstico de una infección por el HPV 18. Ventajosamente, la aplicación de los anticuerpos monoclonales según la presente invención en dicho procedimiento diagnóstico permite una detección muy sensible y fiable de las infecciones por los HPV de alto riesgo, ya que los anticuerpos monoclonales según la presente invención muestran una proporción entre señal y ruido muy alta con un fondo despreciable.

15 Se entiende que el término "muestra biológica" según se emplea en el presente documento se refiere a cualquier tipo de tejido biológico, células y/u órganos, preferentemente biopsias o frotis cervicouterinos, preferentemente una citología cervicouterina.

20 La presente invención también se refiere a un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico basado en un ELISA de infecciones por el HPV 18, que comprende aa) el recubrimiento de un soporte con anticuerpos de captura dirigidos contra las proteínas E7 del HPV, bb) la adición de una muestra biológica, preferentemente de un lisado celular, al soporte recubierto, cc) la incubación del soporte con el anticuerpo monoclonal de detección según la presente invención y dd) la identificación de la proteína E7 del HPV 18 unida específicamente por los anticuerpos de captura mediante la medición y/o la detección del anticuerpo monoclonal de detección unido específicamente a la proteína E7, y permitiendo así el diagnóstico de una infección por el HPV 18. El anticuerpo monoclonal contra el N terminal de la E7 del HPV 18 según la presente invención se usa, preferentemente, como anticuerpo de detección o de captura en este procedimiento. Cuando se usa como anticuerpo de detección en este procedimiento, los anticuerpos según la presente invención están preferentemente biotinilados, dado que esto da lugar a un aumento en la especificidad y en la sensibilidad de la detección de la E7 del HPV.

25 Preferiblemente, se usan anticuerpos policlonales de cabra como los anticuerpos de captura para el procedimiento diagnóstico basado en un ELISA, que son capaces de reconocer las proteínas E7 de los tipos del HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 y 59 de alto riesgo. Dado que estos anticuerpos policlonales de cabra únicamente se unen a las proteínas E7 de los tipos del HPV de alto riesgo, la aplicación de los anticuerpos anti-E7 del HPV 18 como anticuerpo de detección permite ventajosamente la detección de los tipos de alto riesgo del HPV 18, 45, 56, 58, 59 y 70.

30 Como soporte sólido, se usan preferentemente placas de ELISA, pero la persona experta en la materia puede elegir también portadores o materiales diferentes.

35 Los lisados celulares que se van a probar con el procedimiento basado en el ELISA son preparados preferentemente a partir de muestras biológicas, preferentemente de biopsias o de frotis cervicouterinos, preferentemente una citología cervicouterina.

Las realizaciones preferidas adicionales son el asunto en cuestión de las subreivindicaciones.

La lista de secuencias muestra:

40 la SEQ ID nº 1 (no según la presente invención) muestra la secuencia de aminoácidos de un motivo de epítipo consenso C terminal de la proteína E7 de los subtipos del HPV 16 y de los subtipos del HPV 18 y

la SEQ ID nº 2 (no según la presente invención) muestra la secuencia de aminoácidos de un motivo de epítipo consenso C terminal de la proteína E7 de los subtipos del HPV 16 y

45 la SEQ ID nº 3 (no según la presente invención) muestra la secuencia de aminoácidos del epítipo conformacional C terminal de la proteína E7 del HPV 16, que comprende en particular las posiciones 85 hasta 97 de la proteína E7 del HPV 16 y

la SEQ ID nº 4 (no según la presente invención) muestra la secuencia de aminoácidos de un motivo de epítipo consenso C terminal de la proteína E7 de los subtipos del HPV 18 y

50 la SEQ ID nº 5 muestra la secuencia de aminoácidos del epítipo N terminal de la proteína E7 del HPV 18, que comprende en particular las posiciones 5 hasta 13 de la proteína E7 del HPV 18 y

la SEQ ID nº 6 (no según la presente invención) muestra la secuencia de aminoácidos del epítipo conformacional C terminal de la proteína E7 del HPV 16 que comprende las posiciones 86 hasta 97 de la proteína E7 del HPV 16 y

la SEQ ID nº 7 (no según la presente invención) muestra la secuencia de aminoácidos del epítipo

conformacional C terminal de la proteína E7 del HPV 16 que comprende las posiciones 86 hasta 98 de la proteína E7 del HPV 16 y

la SEQ ID nº 8 muestra la secuencia de aminoácidos del epítipo N terminal de la proteína E7 del HPV 18 que comprende las posiciones 4 hasta 13 de la proteína E7 del HPV 18 y

5 la SEQ ID nº 9 (no según la presente invención) muestra la secuencia de ADNc de la cadena pesada del anticuerpo anti-E7 del HPV 16 de la presente invención y

la SEQ ID nº 10 (no según la presente invención) muestra la secuencia de ADNc de la cadena ligera del anticuerpo anti-E7 del HPV 16 de la presente invención.

La presente invención está ilustrada adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes y las figuras anexas.

10 Las figuras muestran:

la Figura 1 muestra la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales de la presente invención para la detección de las proteínas recombinantes E7 mediante un ELISA. Las placas de ELISA se recubrieron con una mezcla (1:1) de los anticuerpos policlonales de cabra contra la E7 del HPV 16 y la E7 del HPV 18. Después se añadieron las proteínas recombinantes E7 a diferentes concentraciones. Posteriormente se añadieron los anticuerpos monoclonales anti-E7 del HPV 16 (1A, no según la presente invención) y anti-E7 del HPV 18 (1B) de la presente invención para la detección de las proteínas recombinantes unidas por los anticuerpos policlonales de cabra, seguido de una incubación con el correspondiente anticuerpo secundario para su visualización.

La Figura 2 muestra la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales biotinilados de la presente invención para la detección de las proteínas recombinantes E7 mediante un ELISA (2 A, B) y la representación logarítmica de las concentraciones de proteína detectadas por los anticuerpos de la presente invención (C, D). Las placas de ELISA se recubrieron con una mezcla (1:1) de los anticuerpos policlonales de cabra contra la E7 del HPV 16 y la E7 del HPV 18. Después se añadieron las proteínas recombinantes E7 a diferentes concentraciones. Posteriormente se añadieron los anticuerpos monoclonales biotinilados anti-E7 del HPV 16 (2A, C, no según la presente invención) y anti-E7 del HPV 18 (2B, D) de la presente invención para la detección de las proteínas E7 unidas por los anticuerpos policlonales de cabra, seguido de una incubación con un conjugado de estreptavidina-Poli-HRP para su visualización. El límite de detección se define como la media de la señal de fondo (doce mediciones) más tres veces la desviación típica.

La Figura 3 muestra que los anticuerpos monoclonales biotinilados de la presente invención no detectan las proteínas recombinantes de los tipos de bajo riesgo del HPV (6, 11) en un ELISA. Las placas de ELISA se recubrieron con una mezcla (1:1) de los anticuerpos policlonales de cabra dirigidos contra la E7 del HPV 16 y la E7 del HPV 18. Después se añadieron las diferentes proteínas recombinantes E7 de los tipos de alto riesgo del HPV (16, 18) y de los tipos de bajo riesgo del HPV (6, 11). Posteriormente se añadieron los anticuerpos monoclonales biotinilados anti-E7 del HPV 16 (3A, no según la presente invención) y anti-E7 del HPV 18 (3B) de la presente invención para la detección de las proteínas E7 unidas por los anticuerpos policlonales de cabra, seguido de una incubación con un conjugado de estreptavidina-Poli-HRP para su visualización.

La Figura 4 muestra la detección de la proteína endógena E7 de células CaSki (positivas para el HPV 16) (4A) y de células HeLa (positivas para el HPV 18) (4B) en el trasfondo de células U-2OS negativas para el HPV con los anticuerpos monoclonales biotinilados de la presente invención mediante un ELISA. Por lo tanto, las placas de ELISA se recubrieron con una mezcla (1:1) de los anticuerpos policlonales de cabra contra la E7 del HPV 16 y la E7 del HPV 18. Se añadieron los lisados celulares con una concentración celular total de 100.000 células por pocillo, que consisten en células U-2OS negativas para el HPV como trasfondo, y se añadieron diferentes cantidades de células CaSki positivas para la E7 del HPV 16 o de células HeLa positivas para la E7 del HPV 18. Posteriormente se añadieron los anticuerpos monoclonales biotinilados anti-E7 del HPV 16 (4A, no según la presente invención) y anti-E7 del HPV 18 (4B) de la presente invención para la detección de las proteínas E7 unidas por los anticuerpos policlonales de cabra, seguido de una incubación con un conjugado de estreptavidina-Poli-HRP para su visualización. El límite de detección se define como la media de la señal de fondo (12 mediciones) más tres veces la desviación típica.

La Figura 5 muestra la detección de la proteína E7 en cinco muestras clínicas (una positiva para el HPV 16, una positiva para el HPV 18 y tres negativas para el HPV) con los anticuerpos monoclonales biotinilados de la presente invención mediante un ELISA. Las placas de ELISA se recubrieron con una mezcla (1:1) de los anticuerpos policlonales de cabra contra la E7 del HPV 16 y la E7 del HPV 18. Se añadieron los lisados de las muestras clínicas (100 µg/pocillo). Posteriormente se añadieron los anticuerpos monoclonales biotinilados anti-E7 del HPV 16 (5A, no según la presente invención) y anti-E7 del HPV 18 (5B) de la presente invención para la detección de las proteínas E7 unidas por los anticuerpos policlonales de cabra, seguido de una incubación con un conjugado de estreptavidina-Poli-HRP para su visualización.

La Figura 6 (no según la presente invención) muestra la detección de la proteína E7 en muestras de LBC de mujeres sanas enriquecidas en células CaSki (positivas para el HPV 16) y en células U-2OS (negativas para el

HPV). La citología basada en líquidos se preparó a partir de un frotis cervical de una Papll pro-band, que no produjo ninguna señal con el anticuerpo anti-E7 del HPV 16. Según se indica, se añadieron 10.000 células de cada una de las CaSki y las U-2OS a la muestra. Las células positivas para la E7 del HPV 16 fueron detectadas específicamente mediante una inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-E7 del HPV 16 a lo largo de una amplia variedad de diluciones de anticuerpo, según se indica.

La Figura 7 (no según la presente invención) muestra la especificidad del anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16 que emplea un ELISA directo mediante el uso de 2,5 y de 10 ng de las proteínas E7 del HPV de diferentes tipos de HPV recubiertas aleatoriamente detectadas por el anticuerpo monoclonal biotinilado contra la E7 del HPV 16 (14 ng/100 μ l) con el tampón como control.

La Figura 8 (no según la presente invención) la figura 8A muestra la detección de las proteínas E7 del HPV 16 de tipo natural y con varias mutaciones expresadas de forma temporal en células U-2OS por parte del anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16 (2 ng/ μ l) seguido de un anticuerpo secundario marcado con alexaFlour488 en experimentos de inmunofluorescencia indirecta, (vector = vector de control vacío, WT = de tipo natural). La Figura 8B muestra la detección de la proteína E7 del HPV 16 de tipo natural y mutada, por parte de anticuerpos policlonales conocidos anti E7 del HPV 16 que no reconocen específicamente el epítipo conformacional en el dominio en dedo de cinc, y que por lo tanto también reconocen las mutaciones relativas a los residuos de cisteína.

La Figura 9 (no según la presente invención) muestra un modelo de la estructura de la proteína E7 del HPV 16 deducida a partir de la estructura de la RMN de la E7 del HPV 45, que contiene dos láminas β (β 1 y β 2) y dos hélices α (α 1 y α 2) como estructuras secundarias. Se indican las cadenas laterales de las cuatro cisteínas (C58, C61, C91, C94) de los dos motivos CXXC que se coordinan con el cinc ubicados a su vez conectando la β 1 y la β 2 y en la hélice α 2 C terminal. Se indica el epítipo 86TLGIVCPICSQK97 (SEQ ID n° 6) en el dedo de cinc carboxilo terminal de la E7 reconocido por el anticuerpo monoclonal. Además, se indica la localización de las mutaciones C terminales Δ 52YNIVT56, Δ 65LRL67, Δ 75DIR77, Δ 79LEDLL83, C58G y C91G. No se indican los N terminales no estructurados ni las mutaciones H2P y C24G.

La Figura 10 (no según la presente invención) muestra un cartografiado de epítipos mediante el uso de péptidos sintéticos de 13 mer de la E7 del HPV 16 en micromatrices que fueron detectados por el anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16, dos anticuerpos de conejo no relacionados y únicamente el anticuerpo secundario (anti-Cy5 de conejo). Específicamente, los péptidos 43 y 44 son reconocidos por el anticuerpo monoclonal anti-E7 del HPV 16 que comprende el epítipo específico.

La Figura 11 muestra la especificidad del anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 18 mediante el empleo de un ensayo de ELISA. Las placas de ELISA se recubrieron con una mezcla (1:1) de los anticuerpos policlonales de cabra contra la E7 del HPV 16 y la E7 del HPV 18. Después se añadieron 100 pg de la proteína E7 recombinante de diferentes tipos de HPV. Posteriormente se añadieron los anticuerpos monoclonales biotinilados anti-E7 del HPV 18 de la presente invención para la detección de las proteínas E7 unidas por los anticuerpos policlonales de cabra, seguido de una incubación con un conjugado de estreptavidina-Poli-HRP para su visualización.

La Figura 12 muestra una inmunotransferencia western con la proteína E7 del HPV 16 y 18 (10 ng) purificada, cargada cada una en un gel de SDS al 12,5 % y sondeada con el anticuerpo contra la E7 del HPV 18, en la que únicamente la proteína E7 del HPV 18 es reconocida por el anticuerpo (panel izquierdo) y los extractos celulares de células HeLa positivas para el HPV 18, de células CaSki positivas para el HPV 16 y de células U-2OS transfectadas bien con un vector vacío o bien con un vector de expresión para la E7 del HPV 18. Los lisados celulares se separaron mediante una SDS-PAGE y se sondearon en una inmunotransferencia western con el anticuerpo contra la E7 del HPV 18 (panel derecho). Únicamente la proteína E7 del HPV 18 es reconocida por el anticuerpo.

La Figura 13 muestra un cartografiado de epítipos mediante el uso de péptidos sintéticos de 11 mer de la E7 del HPV 18 que fueron detectados por el anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 18, dos anticuerpos de conejo no relacionados y únicamente el anticuerpo secundario (anti-Cy5 de conejo). Específicamente, los péptidos 1 a 3 son reconocidos por el anticuerpo monoclonal anti-E7 del HPV 18 que comprende el epítipo específico.

Ejemplo 1

Generación y purificación de anticuerpos monoclonales de conejo (RabMabs)

Se usaron las proteínas E7 purificadas del HPV 16 y del HPV 18 (pureza > 95 %; 4 mg de cada una) (Fiedler et al., J Gen Virol, 2005, 86, 3235-3241 y Fiedler et al., J Virol Methods, 2006, 134, 30-35) para inmunizar conejos, y se prepararon clones de hibridoma de conejo. Los hibridomas seleccionados se pusieron en cultivo y se produjeron los sobrenadantes (2 l de cada uno), que normalmente producían 2 mg del respectivo RabMab. El sobrenadante del hibridoma se diluyó con 1/3 de tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM, a un pH de 7) y se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m. La columna (HiTrapTM Protein G HP de 5 ml; GE Healthcare) se lavó con 5-10 volúmenes de columna de tampón de unión a 5 ml/min. Se aplicó el sobrenadante filtrado y la columna se lavó con 5-10 volúmenes

de columna de tampón de unión; se eluyó con 6 x 2 ml de tampón de elución (glicina-HCl 0,1 M, a un pH de 2,7) en tubos de recolección con 80 µl de Tris-HCl 3 M, a un pH de 9. Después de la elución, la columna se lavó con 5-10 volúmenes de columna de tampón de unión, seguido de 5-10 volúmenes de columna de etanol al 20 %. Las fracciones que contienen la IgG se agruparon y se dializaron durante una noche a 4 °C contra el tampón de diálisis (fosfato de potasio 166 mM, glicina 83 mM, a un pH de 7,2). Después de la diálisis, las muestras se concentraron usando tubos de concentración (Amicon Ultra, MWCO 10.000 Millipore). Finalmente, la muestra se clarificó mediante una centrifugación (13.000 rpm, 4 °C, 10 min) y se determinó la concentración de la IgG usando una DO a 280 nm. Las alícuotas se conservaron en nitrógeno líquido.

Los clones de hibridoma que producen los anticuerpos deseados se seleccionaron después de una prueba adicional, y un clon de hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales anti-E7 del HPV 16 (no según la presente invención) se ha depositado el 16 de diciembre de 2009 en el DSMZ, Braunschweig, Alemania, con el número de acceso DSM ACC 3034, y se ha depositado un segundo clon de hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales anti-E7 del HPV 18 el 16 de diciembre de 2009 en el DSMZ con el número de acceso DSM ACC 3035.

Ejemplo 2

Prueba de reactividad cruzada de los anticuerpos contra la E7

Sobreexpresión en células U-2OS

Se transfectaron de forma temporal células U-2OS (negativas para el HPV) con vectores para la sobreexpresión de las proteínas E7 seleccionadas. Para la microscopía de inmunofluorescencia confocal, las células se fijaron en PFA / PBS al 4 % (p/v) y se permeabilizaron con citrato de sodio al 0,1 % (p/v) / Triton X-100 al 0,3 % (v/v). Después de bloquear con albúmina sérica bovina / PBS al 1 % (p/v), las células se incubaron durante 1 h con el monoclonal anti-E7 del HPV 16 (no según la presente invención) o el anti-E7 del HPV 18 de la presente invención (25 µg/ml) a la temperatura ambiente, y se analizaron mediante una microscopía confocal.

Los resultados demostraron que el anticuerpo anti-E7 del HPV 16 no presentaba reactividad cruzada con las proteínas E7 de otros tipos del HPV, tales como el HPV 18 y el HPV 45, y que el anticuerpo anti-E7 del HPV 18 de la presente invención era capaz de detectar las proteínas E7 del HPV 18 y 45, 11, 56, 58, 59 y 70.

Ensayo de ELISA directo (no según la presente invención)

Para caracterizar de forma más precisa la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16, se usó un ensayo de ELISA directo. Se analizaron diferentes cantidades de proteínas recombinantes E7 del HPV recubiertas aleatoriamente de diferentes tipos de HPV con respecto a la reactividad del anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16.

El ensayo se llevó a cabo como sigue:

se recubrieron los pocillos de placas de microtitulación (Maxisorp F, Nunc, Viena) durante una noche (4 °C) con diferentes cantidades (2,5 y 10 ng) de las proteínas recombinantes E7 del HPV sin marcar producidas en bacterias en 100 µl de tampón de recubrimiento (NaHCO₃ 0,1 M, a un pH de 9,6). Después de lavar tres veces con PBS, a un pH de 7,4, que contiene Tween 20 al 0,05 %, los pocillos se bloquearon con 300 µl de diluyente/bloqueante de caseína universal (UCDB, SDT, Baesweiler, Alemania) durante 2 horas a la temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces. Se añadieron 100 µl de anticuerpo monoclonal primario biotinilado contra la E7 del HPV 16 (la dilución apropiada en UCDB) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado, se añadieron a cada pocillo 100 µl de un conjugado de estreptavidina-PoliHRP40 (SDT, Baesweiler, Alemania, 0,2 µg/ml en UCDB), seguido de 1 hora de incubación a la temperatura ambiente. Después de lavar seis veces, se visualizó la unión con éxito del anticuerpo mediante la adición de 100 µl de un sustrato cromogénico (es(HS)TMB, SDT, Baesweiler, Alemania) a cada pocillo y un seguimiento de la incubación durante 30 min en la oscuridad a la temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2 N y se cuantificó mediante la medición de la absorbancia (450 nm) en un lector de multimarcador (VICTOR TM X5, Perkin Elmer, Viena, Austria).

Según se muestra en la figura 7, el anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16 detectó muy fuertemente la proteína E7 del HPV 16, pero no presentó reactividad cruzada con todos los demás tipos del HPV, incluyendo los otros diez genotipos de alto riesgo del HPV y los dos virus HPV de bajo riesgo más comunes, el HPV 6 y el HPV 11.

Ensayo de ELISA

Para caracterizar de una forma más precisa la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 18 se usó un ensayo de ELISA (véase el ejemplo 5 para el protocolo de ELISA). Se añadieron 100 pg de las respectivas proteínas recombinantes E7 del HPV a los pocillos y se detectaron con el anticuerpo anti-E7 del HPV 18 según la presente invención.

Este experimento demostró que el anticuerpo monoclonal anti-E7 del HPV 18 según la presente invención es muy

específico para las proteínas E7 del HPV 18 y 45 (véase la figura 11), pero no reconoce las proteínas E7 de otros tipos de HPV de alto riesgo.

Inmunotransferencia Western

5 La especificidad del anticuerpo anti-E7 del HPV 18 de la presente invención también fue analizada mediante una inmunotransferencia Western. La proteína recombinante E7 purificada de los tipos del HPV 16 y 18 se separó mediante una SDS-PAGE y se analizó mediante una inmunotransferencia Western usando el anticuerpo anti-E7 del HPV 18. No se obtuvo ninguna señal para la proteína recombinante E7 del HPV 16, mientras que se obtuvieron señales positivas para la E7 recombinante del HPV 18 (Figura 12). De forma análoga, se obtuvieron señales específicas con el anticuerpo anti-E7 del HPV 18, cuando se analizaron los extractos de las células U-2OS
10 transfectadas de forma temporal, que expresan las versiones marcadas con FLAG de la E7 del HPV 18. Finalmente, las proteínas endógenas E7 de las células HeLa positivas para el HPV 18, pero no de las células CaSki positivas para el HPV-16, eran detectables mediante una inmunotransferencia Western (Figura 12).

Ejemplo 3

Detección inmunohistoquímica de la proteína E7 del HPV en biopsias de cáncer cervicouterino

15 Para determinar el estado del HPV en las biopsias cervicouterinas de 30 pacientes, se usó en primer lugar un análisis de PCR para determinar los diferentes genotipos del HPV. 26 (el 87 %) de las biopsias eran positivas para el ADN del HPV, nueve (el 30 %) únicamente contenían el ADN del HPV 16, y tres (el 10 %) únicamente el ADN del HPV 18. Ocho (el 23 %) eran positivas para el HPV 16 y el 18, y seis (el 23 %) contenían el HPV 16, el 18 y otros tipos de HPV. En las cuatro biopsias restantes, el tipo de HPV aparentemente no era detectable mediante el análisis
20 de PCR. Como controles negativos se usaron 22 biopsias cervicouterinas que contienen epitelio normal, pavimentoso y glandular. Para probar si los anticuerpos monoclonales de ratón anti-E7 del HPV 16 (no según la presente invención) y anti-E7 del HPV 18 según la invención podían detectar las proteínas E7 del HPV en secciones en parafina de estas biopsias, se empleó el siguiente protocolo para la inmunohistoquímica.

25 La inmunohistoquímica se llevó a cabo con secciones tisulares incluidas en parafina derivadas de las biopsias cervicouterinas. Se montaron secciones de 2 µm en portaobjetos, se desparafinizaron con xileno (2 x 12 minutos), se rehidrataron y se procesaron para la recuperación del antígeno mediante un tratamiento durante 1 hora en una vaporera en Target Retrieval Solution (DAKO S1700) para la detección de la E7 del HPV. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó mediante una incubación en H₂O₂ al 20 % / metanol durante 30 minutos. Las secciones se lavaron y se incubaron durante 15 minutos en tampón de bloqueo (10 % de suero de cabra o de conejo de DAKOCytomation Alemania, respectivamente, BSA al 5 % en 1x de tampón Tris). La solución de bloqueo se retiró. Las secciones se incubaron bien con los anticuerpos monoclonales biotinilados de conejo anti-E7 del HPV 16
30 (no según la presente invención) o bien anti-E7 del 18 de la presente invención (a las diluciones apropiadas) durante 1 h a la temperatura ambiente en BSA al 5 % / 1x de TBS en una cámara húmeda. Las muestras se aclararon con 1x de Tris / Tween 20 al 0,1 % y se incubaron con IgG secundarias (DAKOCytomation, Alemania) durante 45 min a la temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después de lavar, las muestras se incubaron con un conjugado de estreptavidina peroxidasa (Sigma, Viena) durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos se visualizaron con una solución de DAB (Sigma, Viena) como sustrato. La contratinción se llevó a cabo con Hemalaun (Merck, Viena). Los especímenes se deshidrataron y se montaron usando Entellan (Merck, Viena). La microscopía de campo claro con fotografías se llevó a cabo usando un microscopio Olympus CH30 y una cámara Sony DSC-W15 Cyber-shot.
40

En la totalidad de las 23 biopsias probadas, positivas para el ADN del HPV 16 mediante el análisis de PCR, el anticuerpo anti-E7 del HPV 16 reconoció prácticamente todas las células tumorales epiteliales de los islotes del tumor, pero no tiñó las células de los tejidos conectivos adyacentes. No se detectó la proteína E7 del HPV 16 en los especímenes cervicouterinos normales, ni en el tejido conectivo ni el epitelio glandular cervicouterino ni en el epitelio
45 pavimentoso cervicouterino normal.

Para determinar si la proteína E7 del HPV 18 podía ser detectada por el anticuerpo anti-E7 del HPV 18 de la presente invención, se llevaron a cabo experimentos de inmunohistoquímica usando las biopsias probadas, positivas para el ADN del HPV 18 mediante el análisis de PCR. De una forma similar al anticuerpo anti-E7 del HPV 16, el anticuerpo anti-E7 del HPV 18 tiñó prácticamente todas las células tumorales de los respectivos tumores, pero no
50 tiñó las células del tejido conectivo adyacente. No se detectó tinción en los especímenes cervicouterinos normales.

Sorprendentemente, el anticuerpo anti-E7 del HPV 16 (no según la presente invención), así como el anticuerpo anti-E7 del HPV 18 de la presente invención, pudo detectar la respectiva proteína en las cuatro biopsias en las que el ADN del HPV era indetectable mediante el análisis de PCR, lo que sugiere que las células de estas biopsias estaban de hecho infectadas por el HPV, lo que no fue detectado mediante el análisis de PCR.

55 Ejemplo 4 (no según la presente invención)

Detección de las proteínas E7 del HPV 16 de alto riesgo en una citología basada en líquidos

Tomando como base los resultados obtenidos con las secciones en parafina, se probó si el anticuerpo anti-E7 del HPV 16 puede usarse en una citología basada en líquidos (LBC). Para establecer el procedimiento, se enriquecieron muestras de LBC de mujeres sanas con células CaSki (positivas para el HPV 16) y con células U-2OS (negativas para el HPV) y se procesaron según el siguiente protocolo: se recogieron las células CaSki y las células U-2OS y se resuspendieron en ThinPrep-Buffer (Cytoc SA, Ginebra, Suiza). Los frotis cervicouterinos se resuspendieron en ThinPrep-Buffer, se mezclaron con las células cultivadas y se colocaron entre 10 y 100 µl de la mezcla con una pipeta en un portaobjetos de vidrio ThinPrep (Cytoc SA, Ginebra, Suiza). Las células se dejaron secar durante una noche a la temperatura ambiente. Las células se fijaron usando PFA al 4 % a la TA durante 30 min en una cubeta y se lavaron con una agitación suave 2 x 5 min a la TA con TBS + Tween 20 al 0,05 %. Para la recuperación del antígeno, las células se incubaron con citrato de sodio 10 mM a un pH de 6,0 + Triton X100 al 0,3 % durante 15 min a la TA en una cubeta, se lavaron 2 x 5 min a la TA con TBS + Tween 20 al 0,05 %. Después del bloqueo de la peroxidasa, los portaobjetos se incubaron durante 30 min con 200 µl de suero de cabra normal (DakoCytomation) en una cámara húmeda (dilución a 1:10 en BSA-TBS al 1 % + Tween 20 al 0,05 %). Cada portaobjetos se incubó con 200 µl del anticuerpo primario a la dilución apropiada en BSA-TBS al 1 % + Tween 20 al 0,05 % durante 1 hora a la TA en una cámara húmeda. Los portaobjetos se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (DakoCytomation) a la dilución apropiada en BSA-TBS al 1 % + Tween 20 al 0,05 % durante 1 hora a la TA. Los portaobjetos se lavaron y se incubaron con 200 µl de conjugado de peroxidasa (Sigma; dilución a 1:500 en BSA-TBS al 1 % + Tween 20 al 0,05 %) en una cámara húmeda y posteriormente se aclararon con agua destilada. Para la visualización se usó el kit de sustrato de la peroxidasa SK-4200AEC (Vector, Viena, Austria). La hematoxilina sirvió como contratincción.

Este procedimiento produjo una tinción muy específica de las células CaSki positivas para el HPV 16 con el anticuerpo anti-E7 del HPV 16, mientras que no se tiñeron ni las células cervicouterinas de las probandos sanas ni las células U-2OS, lo que sugiere una especificidad muy alta del anticuerpo (véase la figura 6).

Ejemplo 5

Diagnóstico del HPV basado en un ELISA

Lisis celular

Las células de los cultivos celulares se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón de lisis enfriado en hielo (PBS-Tween al 0,1 %, que contiene 1 comprimido del cóctel inhibidor de la proteasa exento de EDTA completo (Roche) por 50 ml de tampón de lisis). Los lisados se congelaron a -80 °C, se descongelaron a la temperatura ambiente y se centrifugaron (4 °C, 13.000 rpm, 20 min). Los sobrenadantes fueron procesados en el procedimiento de ELISA.

En el caso de muestras clínicas, se recogieron los frotis cervicouterinos del cuello del útero usando una brocha. La brocha se puso inmediatamente en el tubo de recolección que contiene 1 ml de tampón de lisis sin inhibidores de la proteasa (PBS-Tween 20 al 0,1 %). Después de acortar el mango de la brocha y de cerrar el tubo de recolección, la muestra se almacenó inmediatamente a -80 °C hasta su uso. La muestra se descongeló a la temperatura ambiente y se añadieron inmediatamente 20 µl de una solución madre 50x de inhibidor de la proteasa (completa, exenta de EDTA, Roche) por tubo de recolección. Después de resuspender el resto de la muestra de la brocha mezclándola en el tampón de lisis, el resto del líquido de la brocha se limpió en el borde del tubo y la brocha se desechó. La muestra se centrifugó a 4 °C, 13.000 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes fueron procesados en el procedimiento de ELISA.

Protocolo de ELISA

Se añadieron 100 µl de tampón de recubrimiento (NaHCO₃ 0,1 M, a un pH de 9,6) que contiene una mezcla de anticuerpos policlonales de cabra anti-HPV de alto riesgo a cada pocillo de una placa de 96 pocillos (F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate) y se incubaron durante una noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron 3x con el tampón de lavado (PBS, Tween 20 al 0,05 %; a un pH de 7,4); se añadieron 300 µl de tampón de bloqueo (diluyente/bloqueante de caseína universal, SDT) a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas a la temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3x con tampón de lavado, a continuación se añadió la proteína recombinante E7 o el lisado celular (200 µl; diluido en tampón de lisis: PBS, Tween al 0,1 %, inhibidores de la proteasa) y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Los pocillos se aspiraron y se añadieron de nuevo 200 µl de la proteína o del lisado celular y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3x con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de los anticuerpos monoclonales biotinilados de detección (los anticuerpos anti-E7 del HPV 16 no según la presente invención o los anti-E7 del HPV 18 de la presente invención) en su dilución apropiada en diluyente/bloqueante de caseína universal a cada pocillo, se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente y se lavaron 3x con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de un conjugado de SA-PoliHRP (SDT) en su dilución apropiada en diluyente/bloqueante de caseína universal a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavaron 6x con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de reactivo de detección (es(HS)TMB, SDT) a cada pocillo, se incubaron durante 30 min en la oscuridad a la temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de solución de detención (H₂SO₄ 2 N) a cada pocillo y se determinó la absorbancia (450 nm) mediante un lector de ELISA.

Resultados

Para determinar la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales de detección, se probaron cantidades decrecientes de la respectiva proteína recombinante E7 con el protocolo de ELISA. En estas condiciones, 10 pg de la E7 del HPV 16 eran fácilmente detectables por el anticuerpo monoclonal anti-E7 del HPV 16 (no según la presente invención) y se obtuvo una sensibilidad similar para el anticuerpo E7 del HPV 18 con las proteínas E7 del HPV 18 y E7 del HPV 45 (véase la figura 1).

Cuando los anticuerpos monoclonales de detección de la presente invención estaban biotinilados y se incubaban con el conjugado de estreptavidina-poli-HRP en lugar de un anticuerpo secundario, pudo conseguirse una amplificación adicional de la señal. En estas condiciones optimizadas, el límite de detección específico de los anticuerpos monoclonales se redujo hasta 500 fg - 1 pg en el caso de la E7 del HPV 16 (no según la presente invención) y hasta 250 fg - 500 fg para la proteína E7 del HPV 18 (véase la figura 2).

Con estas condiciones también pudo demostrarse que las proteínas de los HPV de bajo riesgo como el HPV 6 o el HPV 11 no son detectadas por el anticuerpo anti-E7 del HPV 16 (no según la presente invención) o el anti-E7 del HPV 18 de la presente invención (véase la figura 3).

Para determinar si este formato de ELISA es adecuado para la detección de las proteínas E7 en células tumorales, se mezclaron células negativas para el HPV (U-2OS) con cantidades decrecientes de células HeLa (positivas para el HPV 18) y de células CaSki (positivas para el HPV 16, no según la presente invención), respectivamente. Las mezclas de células se lisaron y se analizaron mediante un ELISA (véase más arriba). Estos experimentos revelaron que pueden ser detectadas 2.500 - 5.000 células CaSki, así como 500 - 1.000 células HeLa (en el trasfondo de células U-2OS negativas para el HPV) por el respectivo anticuerpo (véase la figura 4).

Para determinar si las proteínas E7 también podían ser detectadas en muestras clínicas con estas condiciones, se probaron frotis cervicouterinos. Para este fin se tomaron dos citologías cervicouterinas consecutivas de pacientes o de probandos sanos. Una muestra se usó para la clasificación citológica según Papanicolaou y la posterior determinación del subtipo de HPV mediante un análisis de PCR. La segunda muestra fue procesada para el protocolo de ELISA (véase más arriba). En total se procesaron cinco muestras (una positiva para el HPV 16, una positiva para el HPV 18 y tres negativas para el HPV), que produjeron unas claras señales por encima del fondo usando los anticuerpos según la presente invención para las muestras positivas para el HPV 16 (no según la presente invención) y el 18, mientras que las muestras negativas para el HPV no produjeron una señal detectable. Estos datos demuestran que la sensibilidad del presente ensayo que emplea los anticuerpos de la presente invención es lo suficientemente alta como para permitir la detección fiable de las proteínas E7 de alto riesgo en muestras clínicas, y permite por lo tanto un diagnóstico fiable de las infecciones por el HPV 18 de alto riesgo (véase la figura 5).

Ejemplo 6 (no según la presente invención)

Análisis mutacional del epítipo conformacional reconocido por el anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16

Para investigar adicionalmente la especificidad del anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16 hacia su epítipo en el dominio C terminal, se transfectaron de forma temporal células U-2OS con vectores de expresión para las E7 mutantes del HPV 16 que se dirigen al N terminal no estructurado, así como los elementos determinantes de la estructura principal del dominio C terminal. Un análisis preliminar de inmunotransferencia western demostró que los niveles de la proteína en todas las E7 mutantes del HPV 16 eran similares o mayores al nivel de la proteína E7 de tipo natural del HPV 16. Para investigar si el anticuerpo monoclonal anti E7 del HPV 16 es capaz de reconocer las E7 mutantes del HPV 16, se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia con las células U-2OS transfectadas de forma temporal. Las proteínas E7 mutantes del HPV 16 analizadas eran: H2P (cambio del residuo de histidina nº 2 por prolina), C24G (cambio del residuo de cisteína nº 24 por glicina), deleciones en la lámina β 1 (Δ 52YNIVT56), en la lámina β 2 (Δ 65LRL67) y en la hélice α 1 (Δ 75DIR77 y Δ 79LEDLL83), así como mutaciones puntuales en el sitio de coordinación del cinc del dominio en dedo de cinc (C58G, C91G y C58G/C91G). Las posiciones de las mutaciones en la proteína E7 del HPV 16 también están indicadas en la figura 9.

Según se muestra en la figura 8A, el anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16 reconocía todos los mutantes de deleción, pero no era capaz de reconocer las mutaciones puntuales concernientes a los residuos de cisteína del sitio de coordinación del cinc. Esto indica que el epítipo reconocido está localizado en la estructura en dedo de cinc, y lo que es más importante, es necesario un dominio intacto en dedo de cinc, que no puede formarse si uno o más residuos de cisteína están mutados, para el reconocimiento eficaz de la proteína E7 del HPV 16 por parte del anticuerpo monoclonal anti E7 del HPV 16. Por el contrario, según se muestra en la Figura 8B, los anticuerpos policlonales conocidos contra la E7 del HPV 16 que no reconocen el epítipo conformacional específico reconocido por el anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16 también pueden detectar las mutaciones concernientes a los residuos de cisteína del dominio en dedo de cinc.

Para los experimentos de inmunofluorescencia indirecta se usó el siguiente protocolo: las células se fijaron con PFA al 4 % (p/v) / 1x de PBS, se permeabilizaron con citrato de sodio al 0,1 % (p/v) / Triton-X-100 al 0,3 % (v/v), se bloquearon con 1x de PBS / BSA al 1 % y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con el

anticuerpo anti E7 del HPV 16 en 1x de PBS / BSA al 1 %. Después de lavar con 1x de PBS y de una tinción con un anticuerpo secundario marcado con alexaFlour488 (DAKOCytomation, Hamburg), las células se procesaron para la microscopía de inmunofluorescencia indirecta y se observaron usando un sistema de barrido por láser confocal.

Ejemplo 7

5 Cartografiado de epítomos

Los epítomos de la E7 del HPV 16 se analizaron mediante JPT Peptide Technologies GmbH (Berlín, Alemania) usando micromatrices peptídicas. Para hacer esto se incubó una colección de 44 péptidos de 13 mer diferentes derivados de la E7 del HPV 16, posicionados en el péptido, con las micromatrices del anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16 (no según la presente invención) y con anticuerpos de control de conejo no relacionados. La determinación de la unión péptido-anticuerpo se llevó a cabo mediante un análisis RepliTope en el que la micromatriz peptídica se incubó con el anticuerpo primario, seguido de un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente (anti-conejo-Cy5). Después de lavar las micromatrices peptídicas, se secaron usando una centrifuga de micromatrices y se escanearon con un sistema de escaneo de matrices de alta resolución con los apropiados ajustes en la longitud de onda.

15 Según se muestra en la Figura 10 (no según la presente invención), los péptidos 43 y 44 que comprenden los aminoácidos 85 hasta 97 (SEQ ID nº 3) y 86 hasta 98 (SEQ ID nº 7), respectivamente, son reconocidos específicamente por el anticuerpo monoclonal contra la E7 del HPV 16, lo que indica que estos aminoácidos representan el epítomo reconocido.

20 De forma análoga, se usó una colección de 47 péptidos de 11 mer solapantes diferentes derivados de la E7 del HPV 18 para el cartografiado de los epítomos del anticuerpo anti-E7 del HPV 18 según la presente invención. Las micromatrices peptídicas se incubaron con el anticuerpo anti-E7 del HPV 18, así como dos anticuerpos monoclonales no relacionados.

25 Según se muestra en la Figura 13, los péptidos 1 a 3 que comprenden los aminoácidos N terminales 4 hasta 13 de la proteína E7 del HPV 18, son reconocidos específicamente por el anticuerpo anti-E7 del HPV 18 de la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AWS

<120> Anticuerpo E7

<130> 203035 PCT

<150> EP10011978

<151> 30-09-2010

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> E7 de los subtipos HPV 16 y 18

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 1

Val	Cys	Pro	Xaa	Cys
1				5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> E7 de los subtipos HPV 16

ES 2 712 892 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(5)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 2

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Val Cys Pro Xaa Cys
 1 . 5 10

15 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> HPV16-E7

20 <400> 3

Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys
 1 5 10

25 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> E7 del subtipo HPV 18

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

40 <400> 4

Phe Val Cys Pro Xaa Cys Ala Xaa Xaa Gln
 1 5 10

45 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> HPV18-E7

<400> 5

Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu
 1 5 .

50 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> HPV16-E7

55 <400> 6

ES 2 712 892 T3

Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys
1 5 10

5 <210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> HPV16-E7

10 <400> 7

Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
1 5 10

15 <210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> HPV 18 E7

<400> 8

20 Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu
1 5 10

25 <210> 9
<211> 1380
<212> ADN
<213> cadena pesada del anticuerpo anti-E7 del HPV16

<400> 9

ES 2 712 892 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaagggtg ccagtgtcag 60
 tcgctggagg agtccggggg tcgcctggta acgcctggag ggccctgac actcacctgc 120
 acagtctctg gaatcgacct cagtacctat gaaataagct gggcccgcca ggctccaggg 180
 aaggggctgg aatggatcgg aatcattggt actagcgcta acacagtcta cgcgagctgg 240
 gcgaaaggcc gattcaccat ctccaaatcc tcgaccacgg tggatctgag ggtgaccagt 300
 ctgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgcccggt cctacgatga atatggtatt 360
 catgcttttc atccctgggg cccaggcacc ctggtcaccg tctcctcagg gcaacctaa 420
 gctccatcag tcttcccact ggccccctgc tgcggggaca caccagctc cacggtgacc 480
 ctgggctgcc tgggtcaaagg gtacctcccg gagccagtga ccgtgacctg gaactcgggc 540
 acctcacca atgggttacg caccttcccg tccgtccggc agtcctcagg cctctactcg 600
 ctgagcagcg tggtagcgt gacctcaagc agccagcccg tcacctgcaa cgtggcccac 660
 ccagccacca acaccaaagt ggacaagacc gttgcgccct cgacatgcag caagcccacg 720
 tgcccacccc ctgaactcct ggggggaccg tctgtcttca tcttcccccc aaaacccaag 780
 gacaccctca tgatctcagc caccocgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccag 840
 gatgaccccg aggtgcagtt cacatggtac ataaacaacg agcaggtgcg caccgcccgg 900
 ccgcccgtac gggagcagca gttcaacagc acgatccgcg tggtcagcac cctccccatc 960
 gcgcaccagg actggtgag gggcaaggag ttcaagtgca aagtcacaaa caaggcactc 1020
 ccggccccc a tcgagaaaac catctccaaa gccagagggc agcccctgga gccgaaggtc 1080
 tacaccatgg gccctccccg ggaggagctg agcagcaggt cggtcagcct gacctgcatg 1140
 atcaacggct tctacccttc cgacatctcg gtggagtggg agaagaacgg gaaggcagag 1200
 gacaactaca agaccacgcc ggccgtgctg gacagcgacg gctcctactt cctctacagc 1260
 aagctctcag tgcccacgag tgagtggcag cggggcgacg tcttcacctg ctccgtgatg 1320
 cacgaggcct tgcaacaacca ctacacgcag aagtccatct cccgctctcc gggtaaatga 1380

<210> 10
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> cadena ligera del anticuerpo anti-E7 del HPV16
 <400> 10

5

ES 2 712 892 T3

atggacacga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc	60
acatttgccc aagtgctgac ccagactcca tcccctgtgt ctgcagetgt gggaggcaca	120
gtcaccatca actgccaggc cagtcagagt gtttataatg ccaaaaattt agcctggtat	180
cagcagaaac cagggcagcc tcccaagctc ctgatttacc aggcttccac tctggcatct	240
ggggtcccat cgcggttcaa aggcagtgga tctgggacac agttcactct caccatcagc	300
ggcgtgcagt gtgacgatgc tgccacttac tactgtcaag gcgaatttag ttgtagtagt	360
gctgattgta atgttttcgg cggagggacc gaggtggtgg tcaaaggaga tccagttgca	420
cctactgtcc tcatcttccc accagctgct gatcaggtgg caactggaac agtcaccatc	480
gtgtgtgtgg cgaataaata ctttcccgat gtcaccgtca cctgggaggt ggatggcacc	540
acccaaacaa ctggcatcga gaacagtaaa acaccgcaga attctgcaga ttgtacctac	600
aacctcagca gcactctgac actgaccagc acacagtaca acagccacaa agagtacacc	660
tgcaaggaga cccagggcac gacctcagtc gtccagagct tcaatagggg tgactgttag	720

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular de hibridoma, que tiene el número de acceso DSM ACC3035.
2. Un anticuerpo monoclonal, obtenible a partir del sobrenadante de la línea celular de hibridoma según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal anti-E7 del HPV, que es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región N terminal de la proteína E7 del HPV 18, en el que el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID nº 5 u 8.
3. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo está marcado con un grupo radioactivo, enzimático o fluorescente.
4. Una composición diagnóstica, que comprende el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 o 3 como agente activo.
5. Un kit diagnóstico, que comprende el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 o 3 como primer agente, y anticuerpos dirigidos contra las proteínas E7 del HPV como segundo agente.
6. Un procedimiento *in vitro* para la detección de la proteína E7 del HPV 18, que comprende
 - i) la incubación de una muestra biológica con el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 o 3 y
 - ii) la medición y/o la detección de la proteína E7 del HPV 18 en la muestra biológica mediante la medición y/o la detección del anticuerpo unido específicamente a la proteína E7.
7. Un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico con una base inmunológica, preferentemente inmunohistoquímica o inmunofluorescente, de infecciones por el HPV 18, que comprende
 - a) la incubación de una muestra biológica con el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 o 3 y
 - b) la detección de la proteína E7 del HPV 18 en la muestra biológica mediante la detección del anticuerpo unido específicamente a la proteína E7 y permitiendo así el diagnóstico de una infección por el HPV 18.
8. Un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico basado en un ELISA de infecciones por el HPV 18, que comprende
 - aa) el recubrimiento de un soporte con anticuerpos de captura dirigidos contra las proteínas E7 del HPV,
 - bb) la adición de una muestra biológica al soporte recubierto,
 - cc) la incubación del soporte con el anticuerpo de detección monoclonal según la reivindicación 2 o 3,
 - dd) la identificación de la proteína E7 del HPV 18 unida específicamente por los anticuerpos de captura mediante la detección del anticuerpo monoclonal de detección unido específicamente a la proteína E7, y permitiendo así el diagnóstico de una infección por el HPV 18.
9. Uso del anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 o 3 para la preparación de una composición diagnóstica para la detección *in vitro* de la proteína E7 del HPV 18 en una muestra biológica.
10. Uso del anticuerpo monoclonal según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo está unido, fijado y/o conectado a un soporte sólido.
11. Un procedimiento para la preparación de una composición diagnóstica, que comprende la etapa de formular el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 o 3 con un portador, un diluyente, un tampón o una solución de conservación aceptable.
12. Uso de una composición diagnóstica que comprende el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 o 3 para la detección inmunológica, preferentemente basada en un ELISA, de la proteína E7 del HPV 18 en una muestra biológica, en el que el anticuerpo está unido, fijado y/o conectado a un soporte sólido.

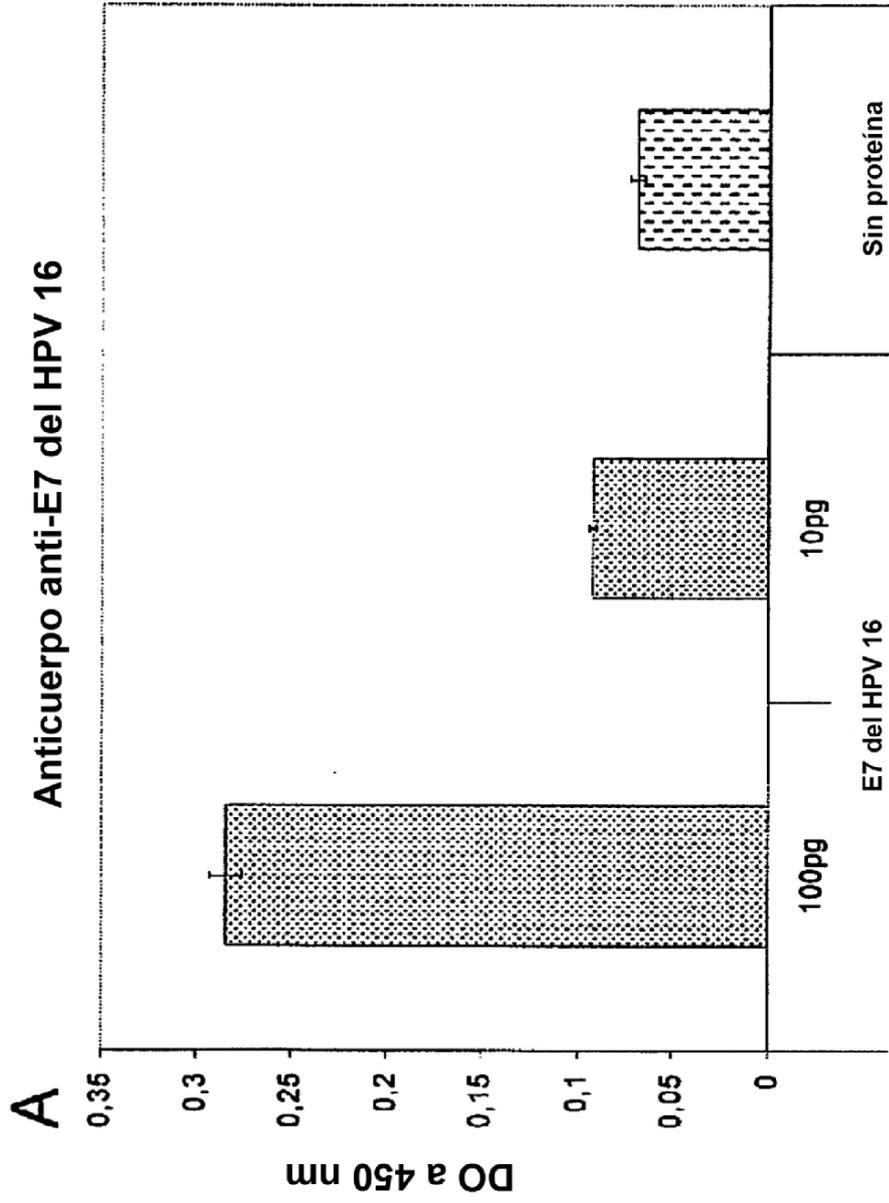


Figura 1

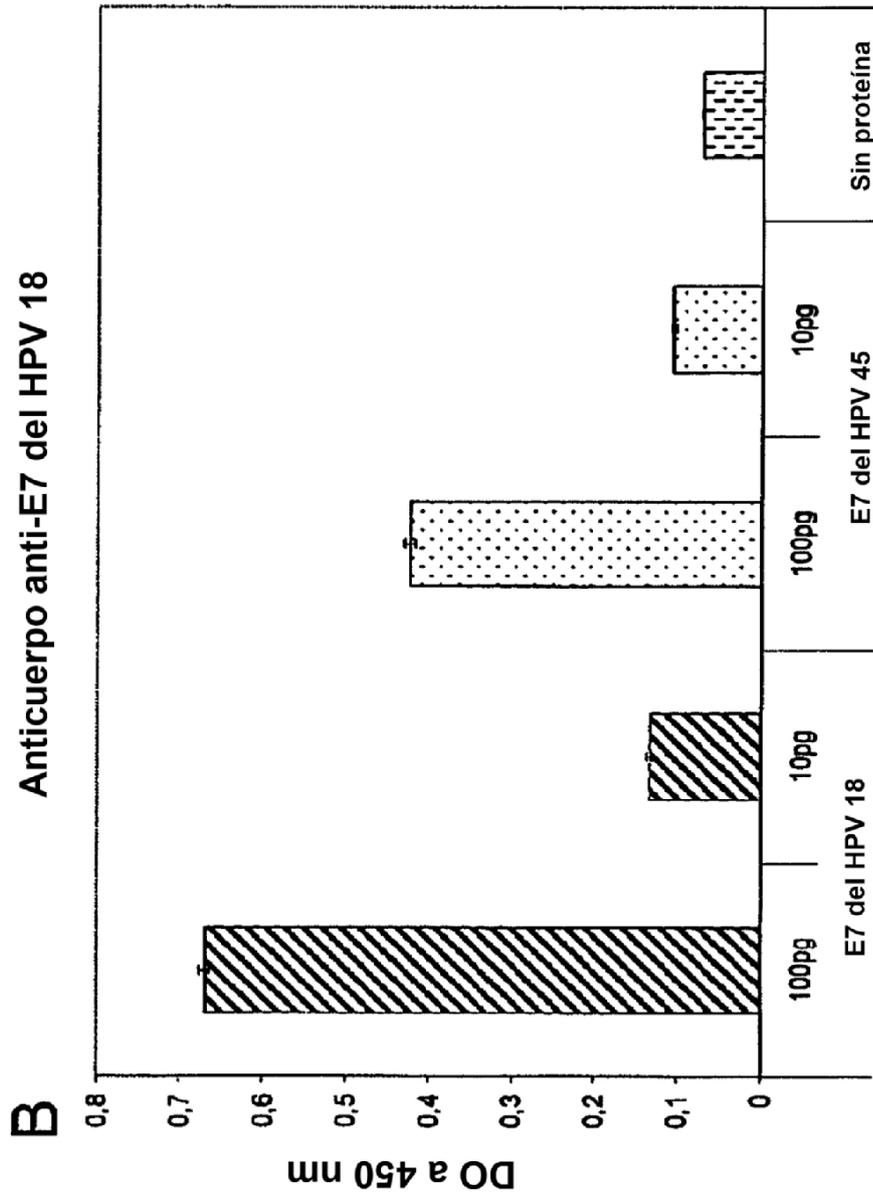


Figura 1

Figura 2

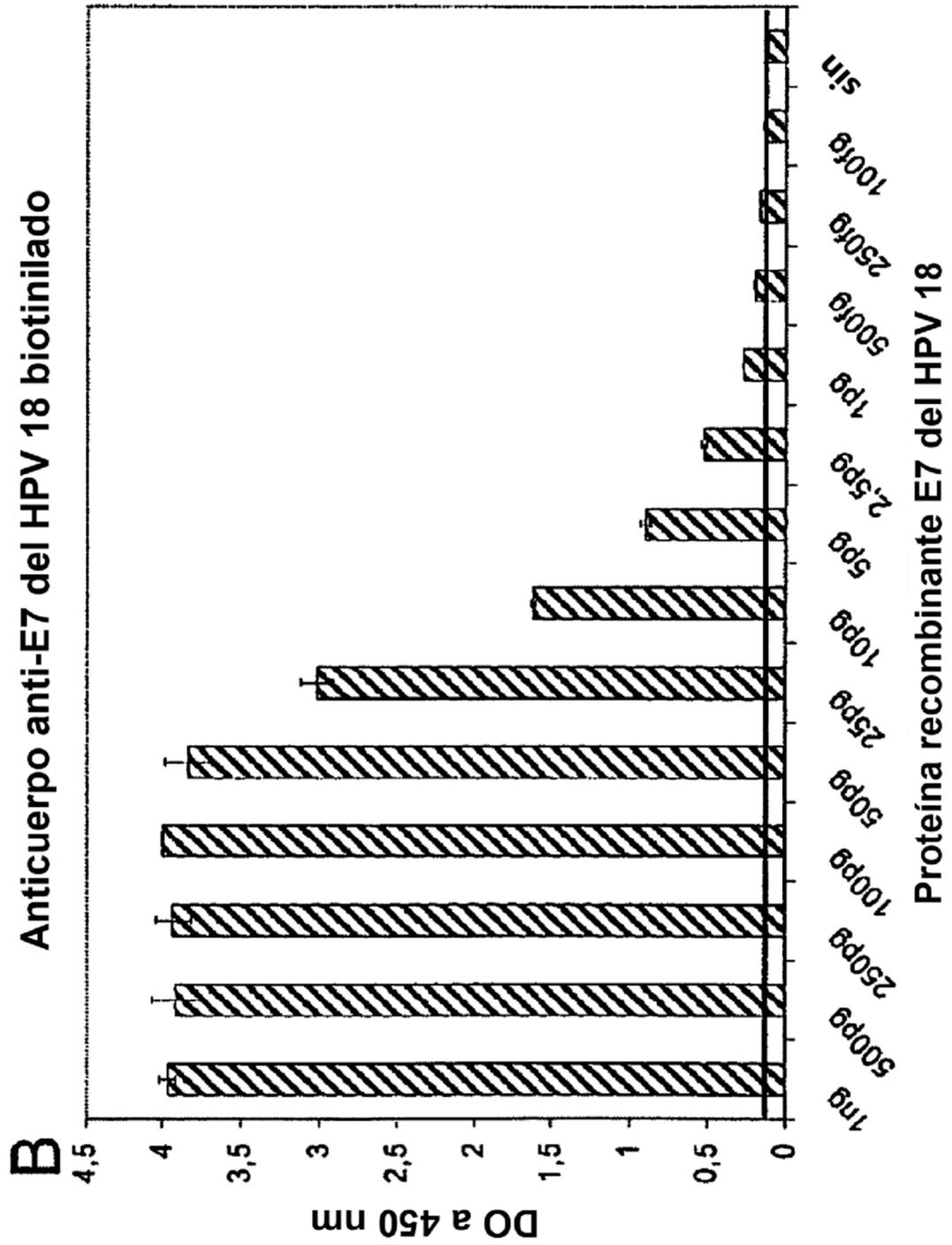


Figura 2

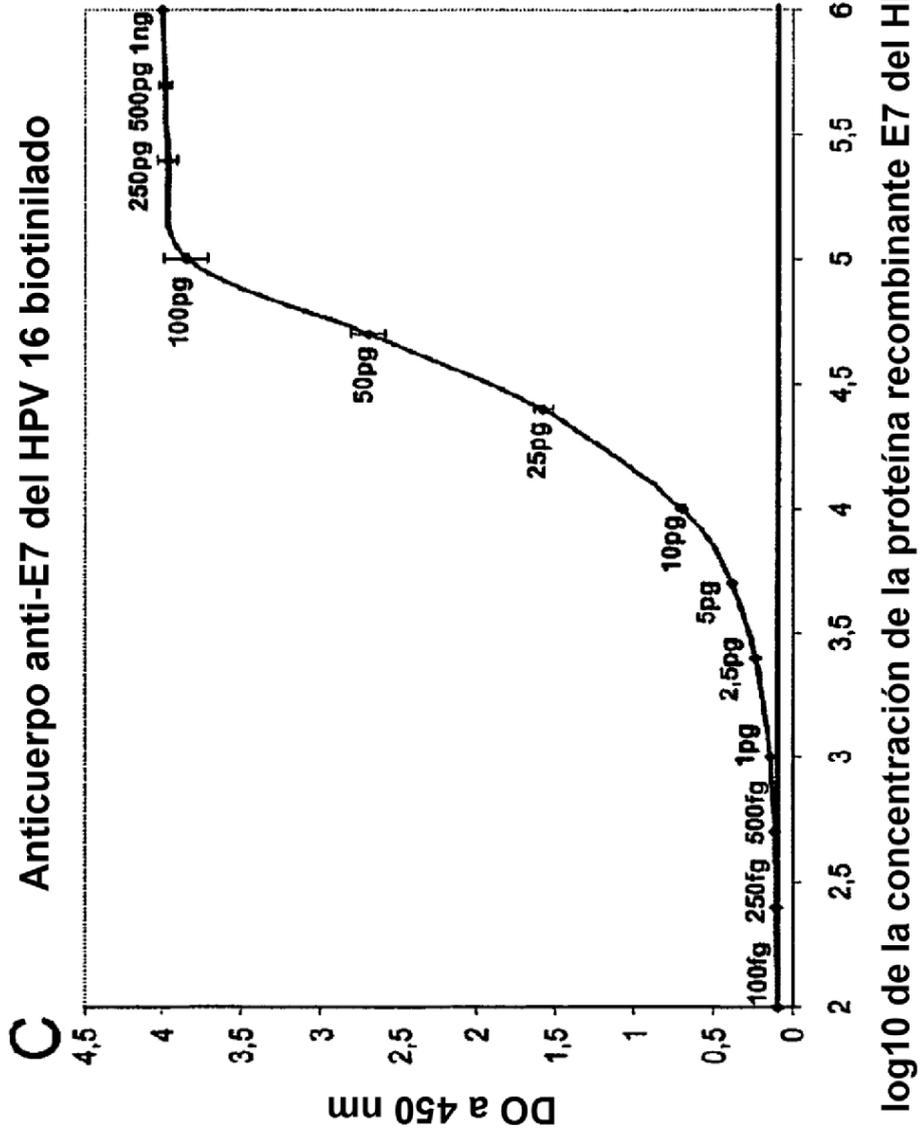


Figura 2

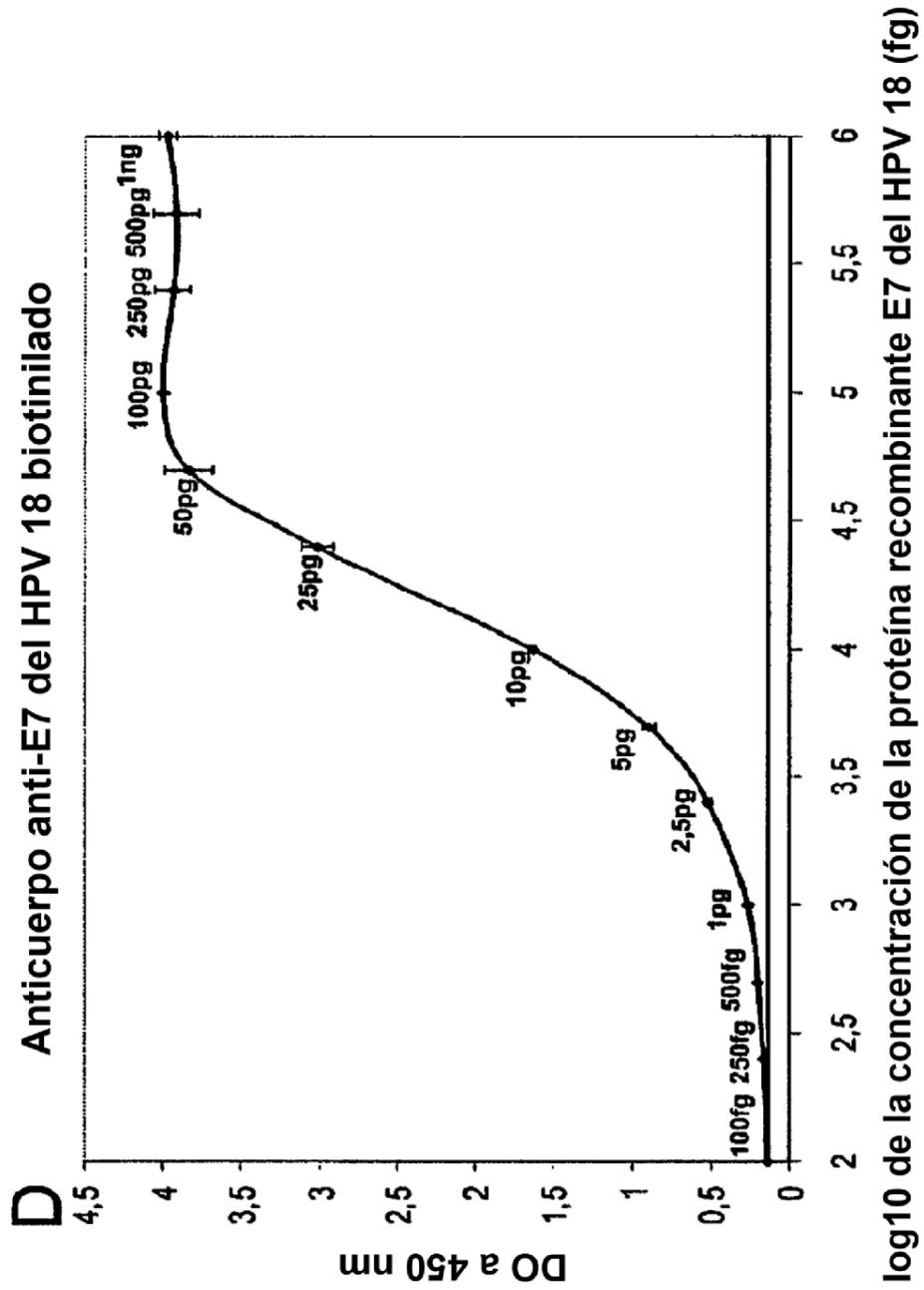
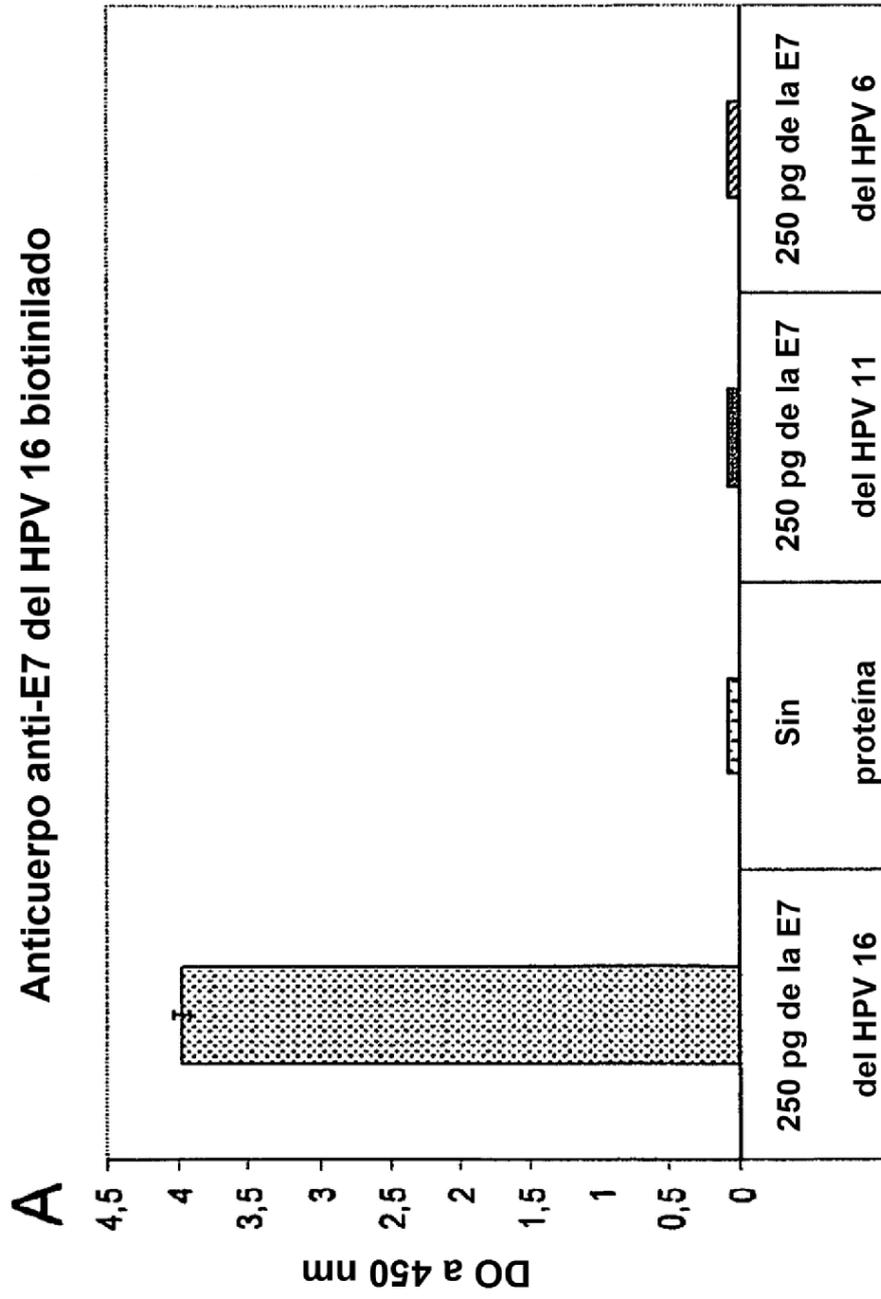


Figura 3



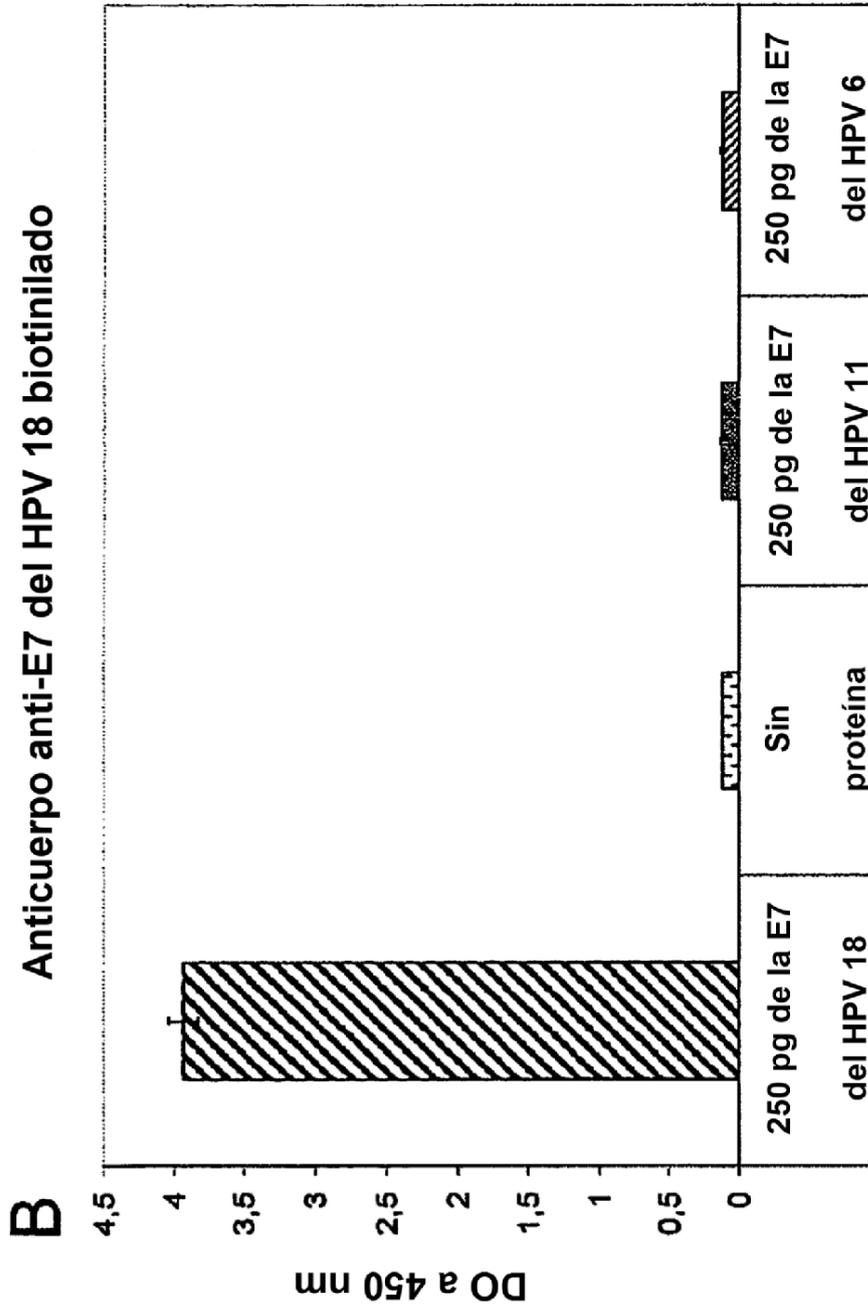


Figura 3

Figura 4

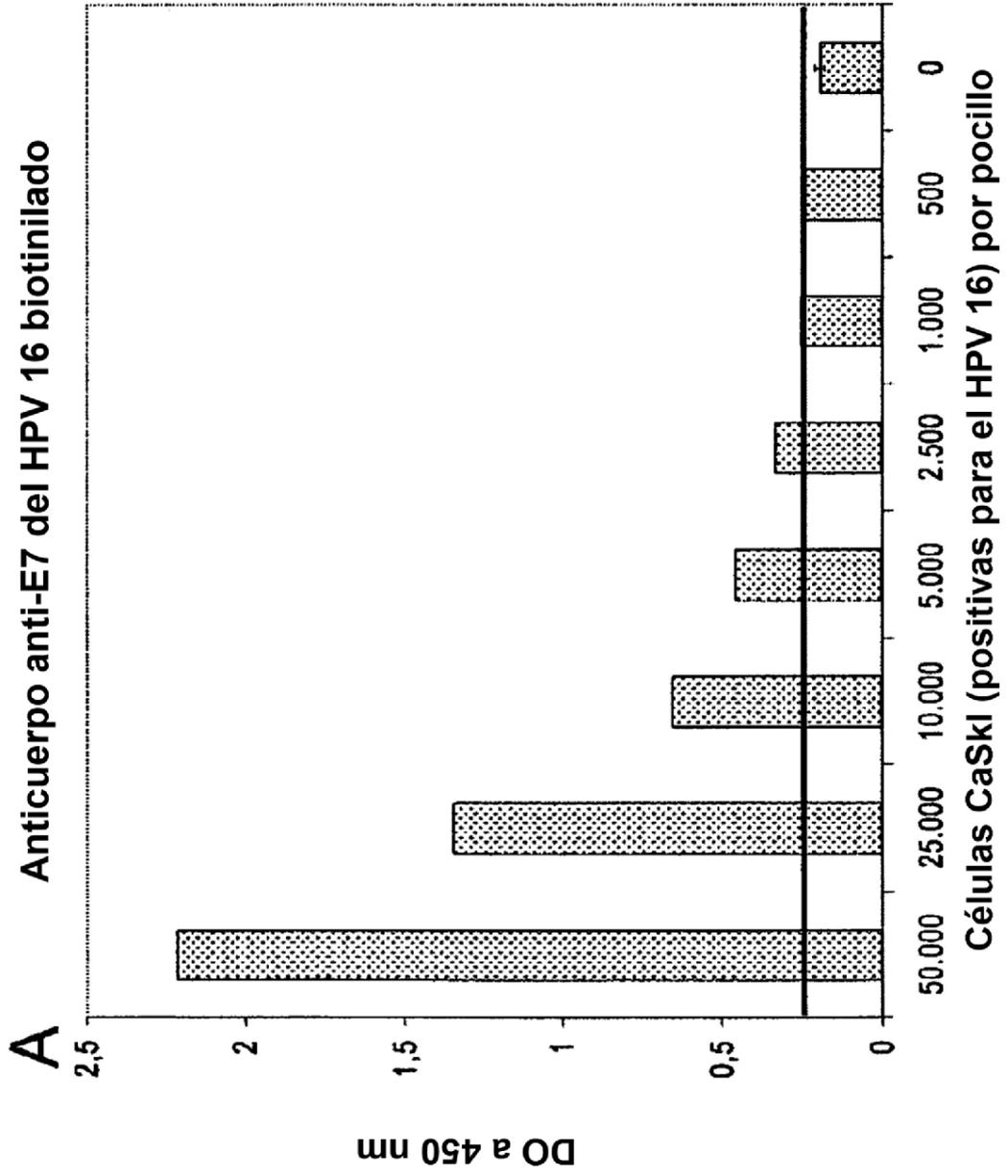


Figura 4

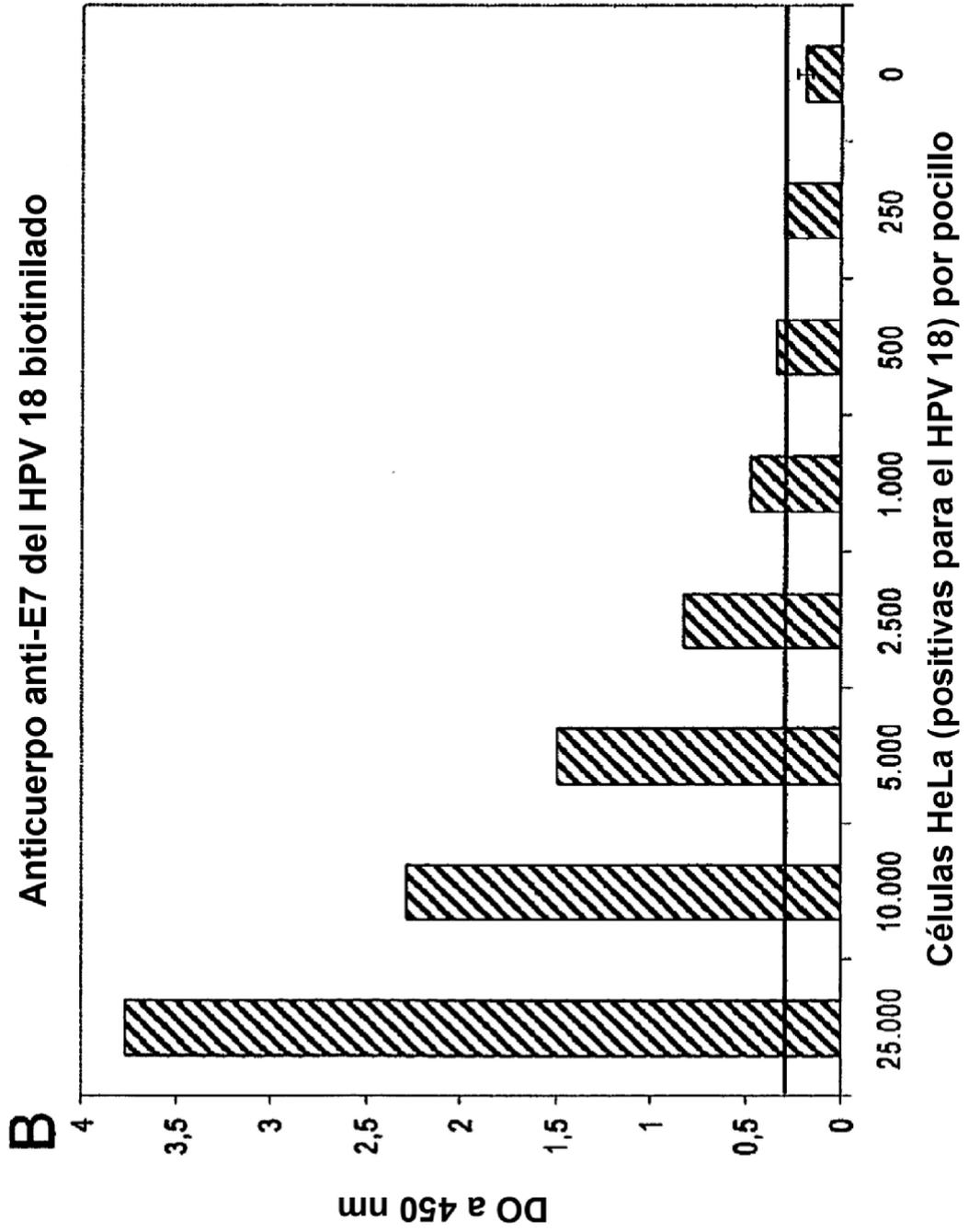


Figura 5

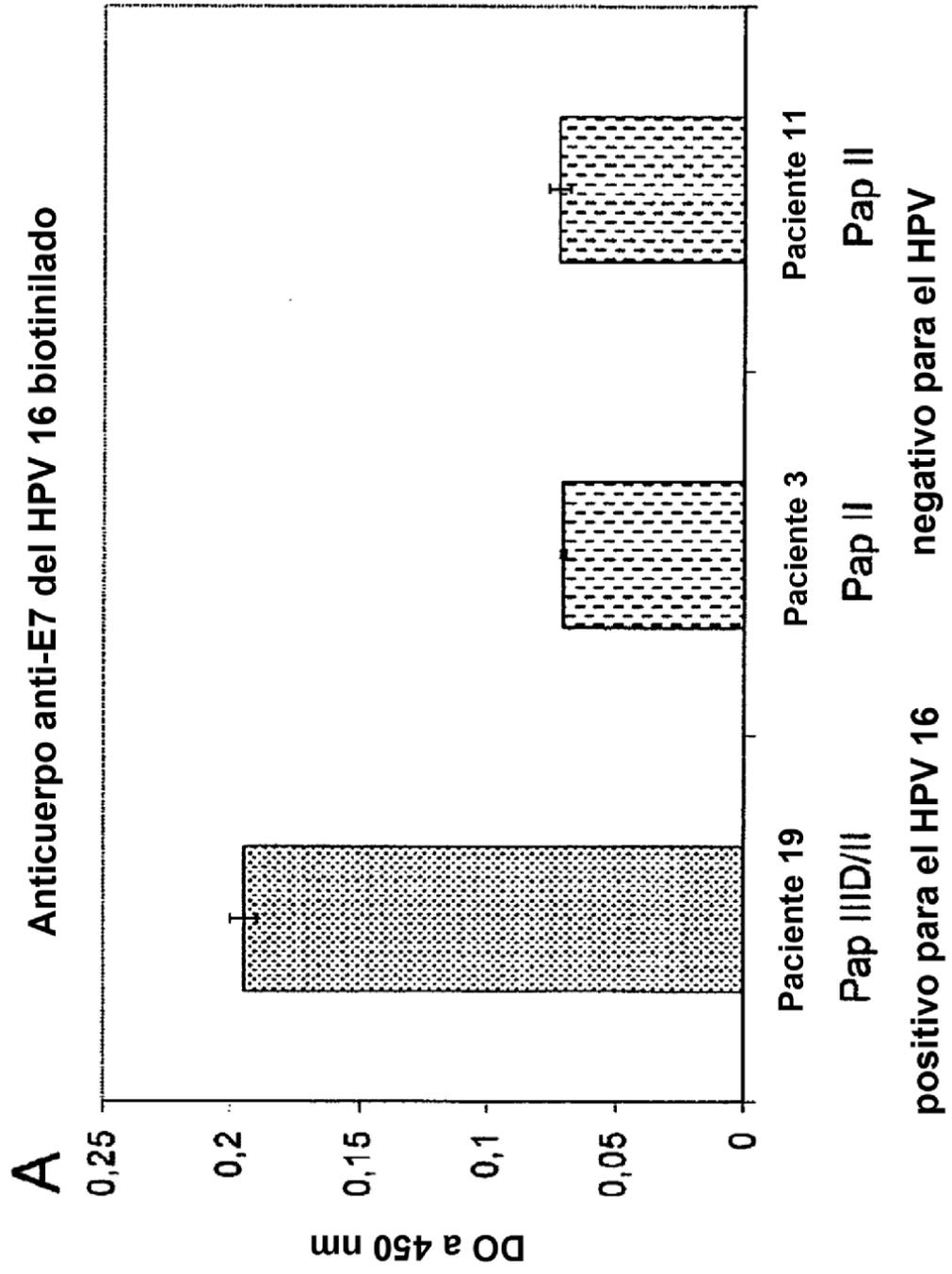


Figura 5

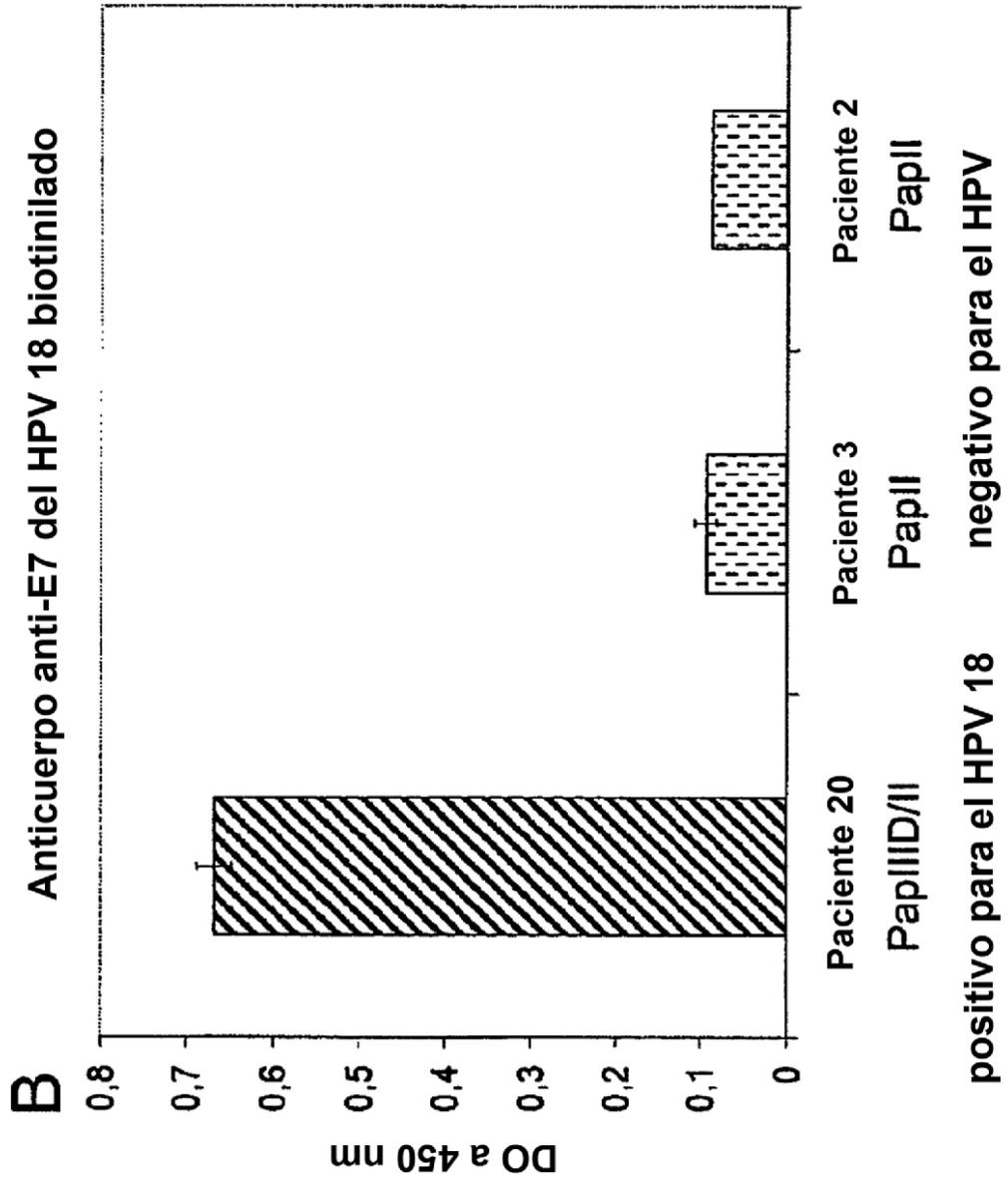


Figura 6

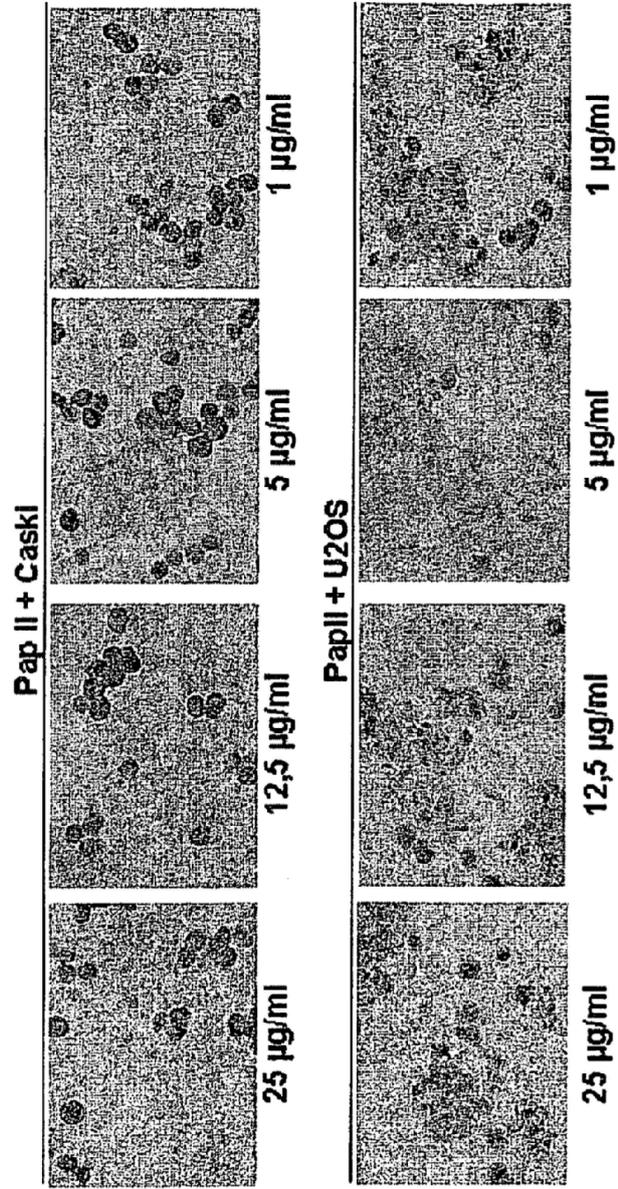
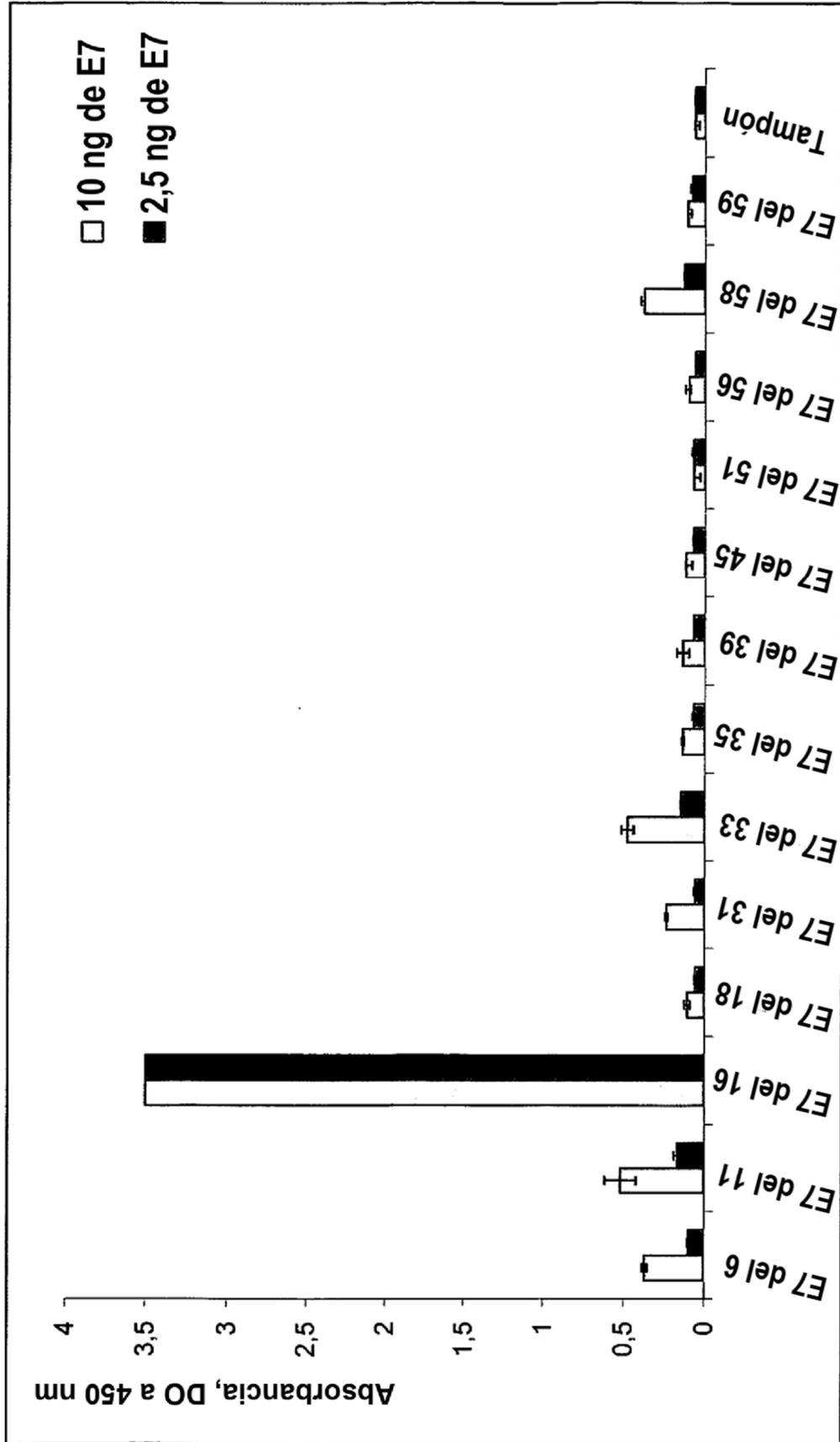


Figura 7



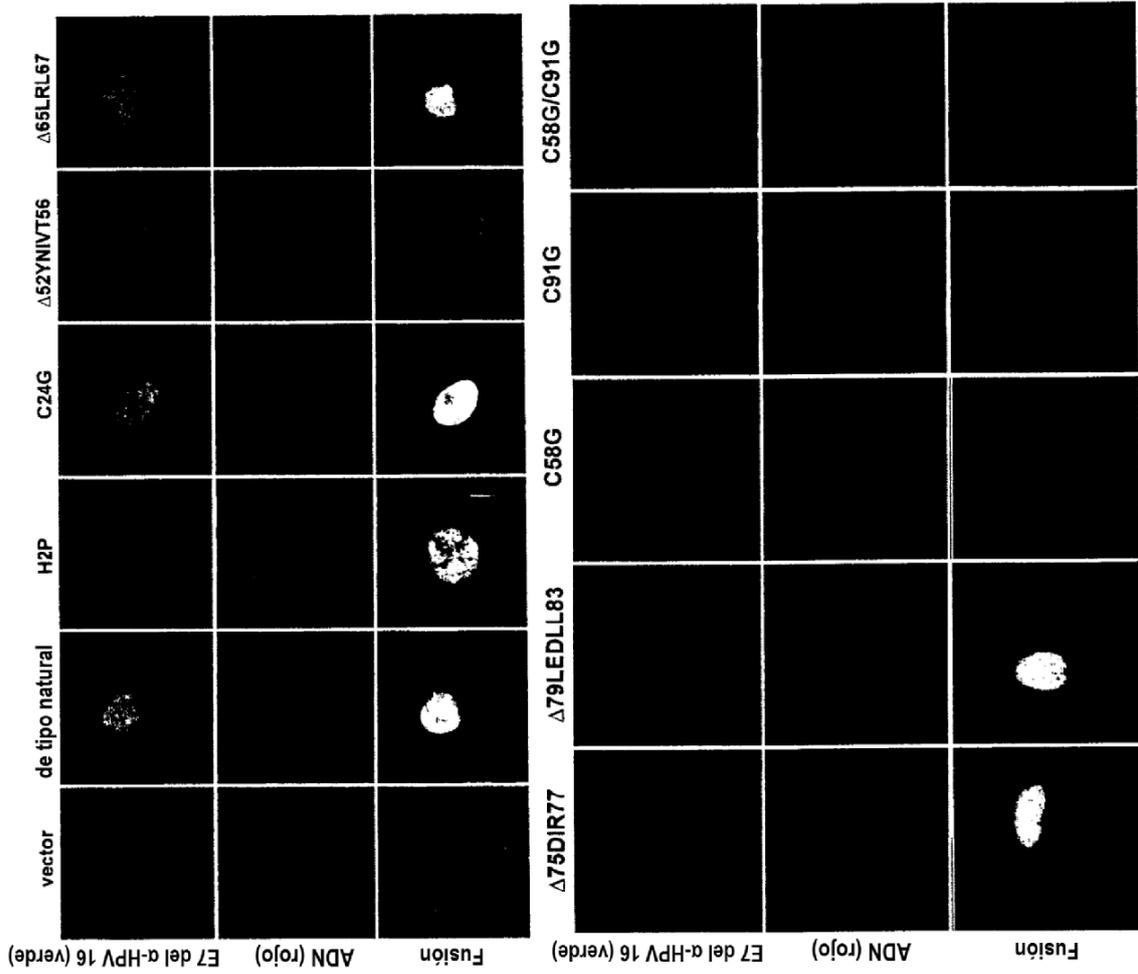
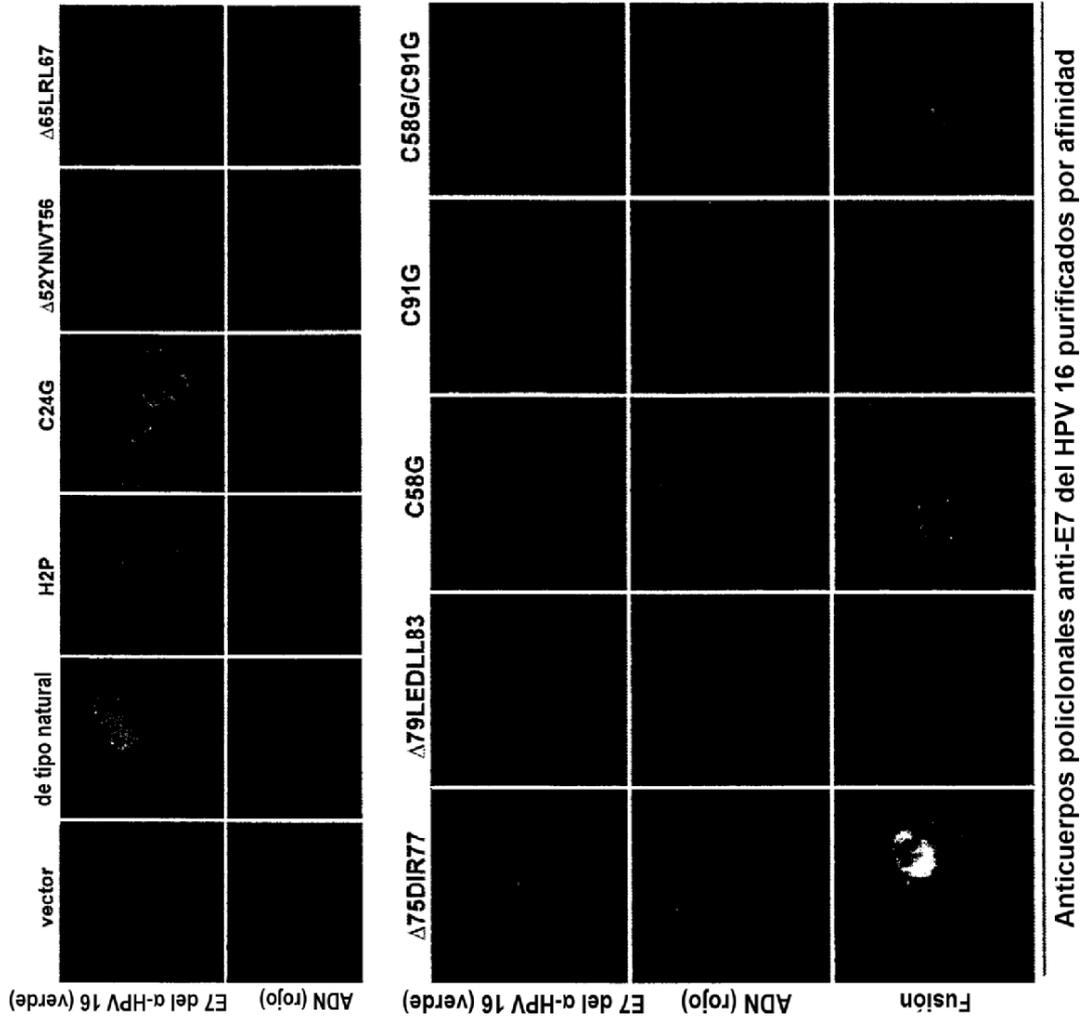


Figura 8 A

Figura 8 B



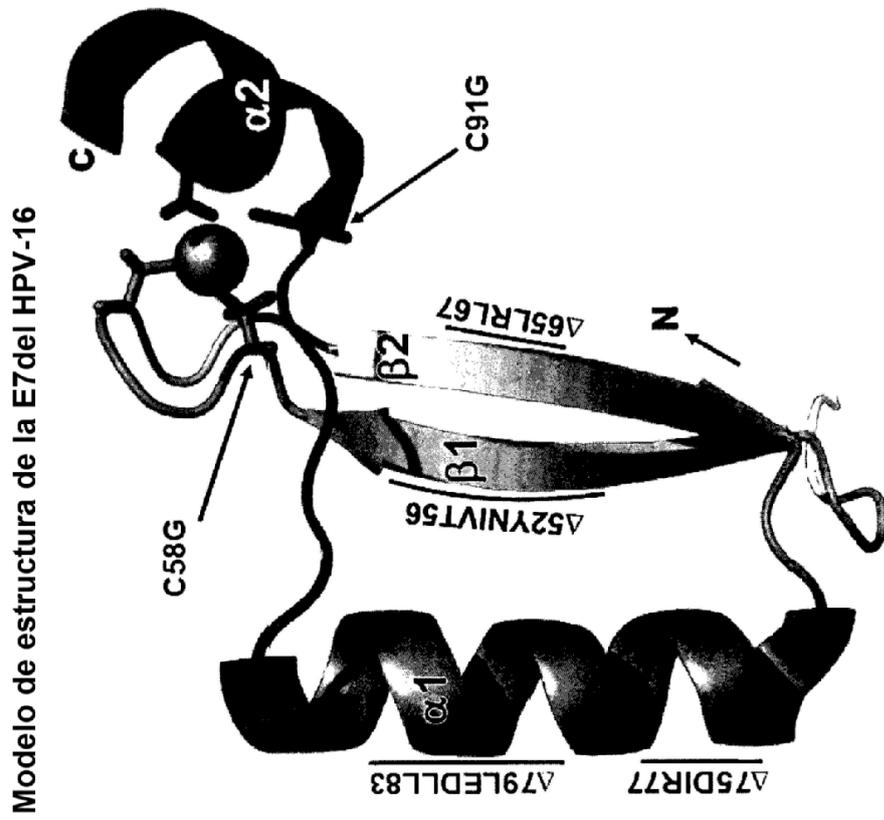
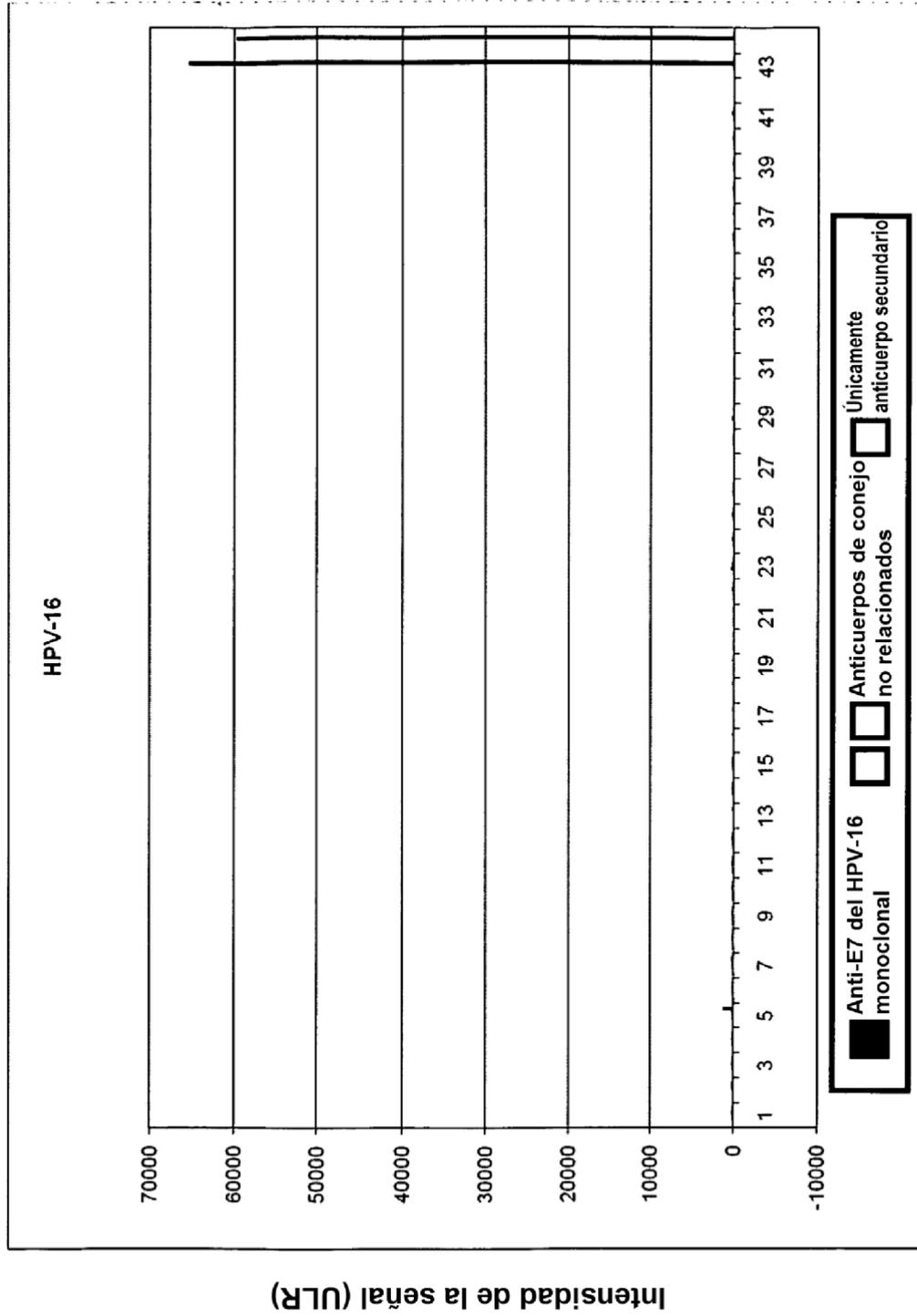
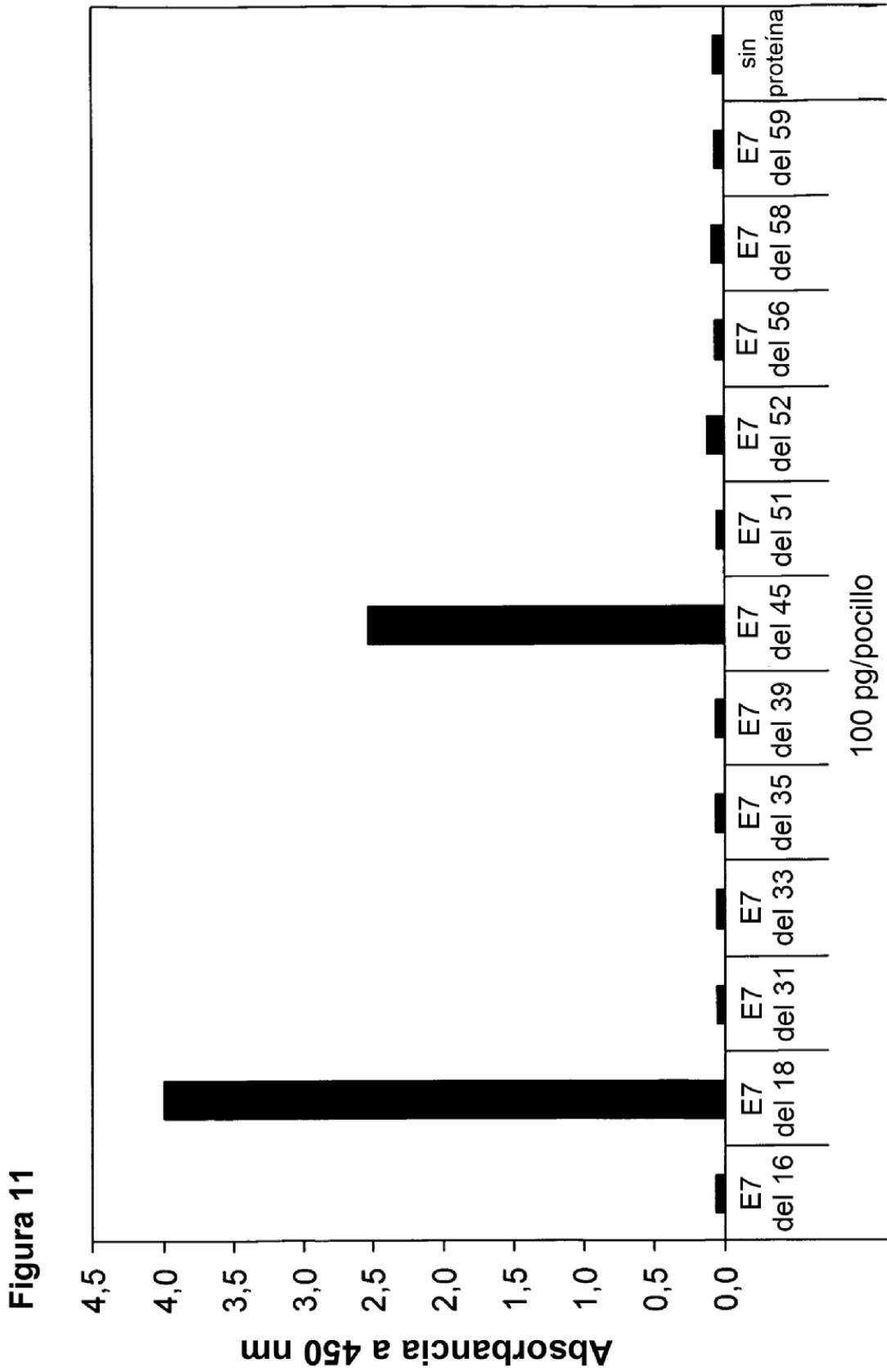


Figura 9

Figura 10





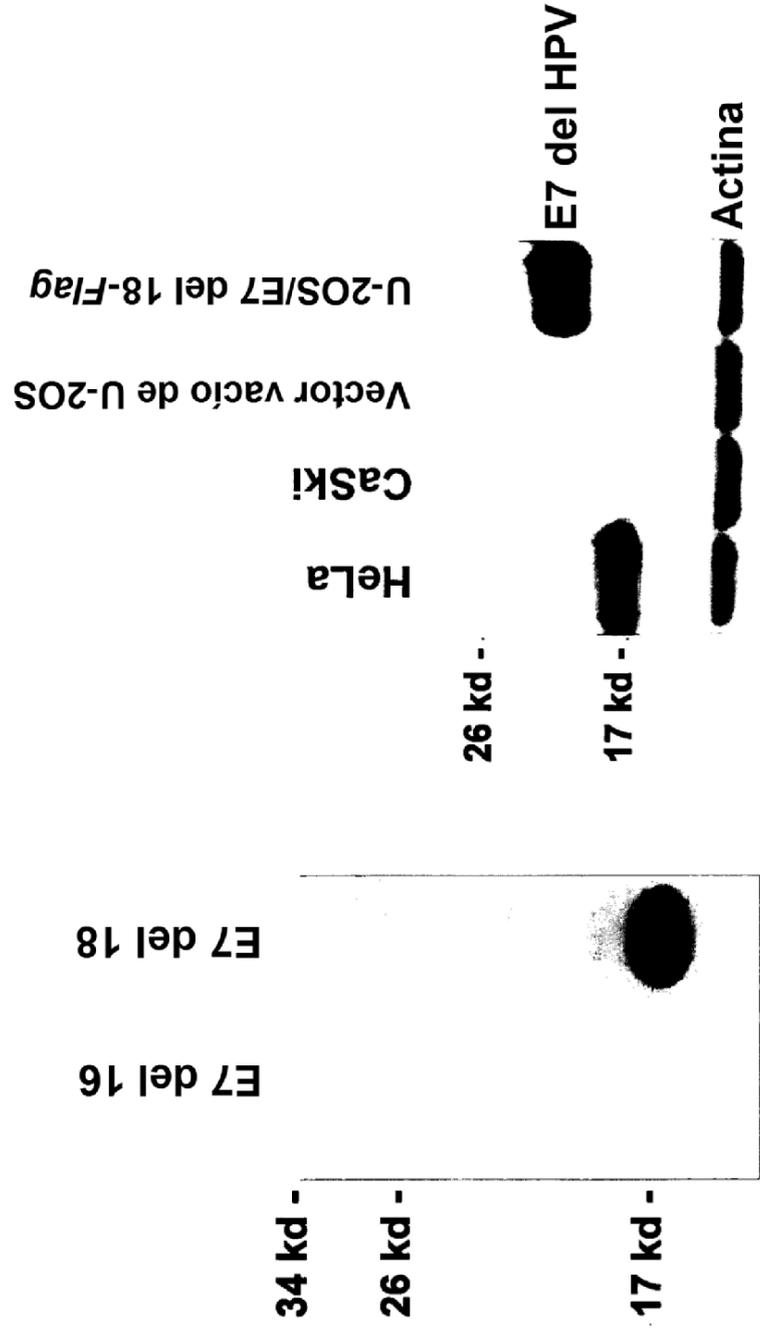


Figura 12

Figura 13

