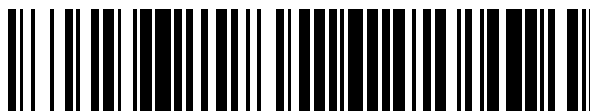


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 485**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2016 E 16173776 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3254690**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal que inhibe las funciones inmunosupresoras de *Helicobacter pylori*, fragmento de unión a antígeno del mismo e hibridomas que producen dicho anticuerpo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2020

73 Titular/es:

**SAGABIO CO., LTD. (100.0%)
6th Floor, 34-1 JioChuan Street
Taipei City 10367, TW**

72 Inventor/es:

**LIAO, KUANG-WEN;
LIN, YU-LING y
JIAN, TING-YAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 773 485 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 que inhibe las funciones inmunosupresoras de *Helicobacter pylori*, fragmento de unión a antígeno del mismo e hibridomas que producen dicho anticuerpo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que inhibe las funciones inmunosupresoras de un patógeno, a un fragmento de unión a antígeno del mismo, y a hibridomas que producen dicho anticuerpo, y especialmente a un anticuerpo monoclonal que inhibe las funciones inmunosupresoras proporcionadas por una sustancia inmunosupresora secretada o producida por el patógeno, para mejorar el sistema inmunitario del huésped del patógeno, y a su fragmento de unión a antígeno y a hibridomas que producen el anticuerpo.

15 Antecedentes de la invención

La *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gram-negativa que infecta a la mitad de la población adulta a lo largo del mundo. La inflamación crónica desencadenada por *H. pylori* puede desembocar en resultados variables, tales como úlceras pépticas y cáncer gástrico, dependiendo del grado y la extensión de la gastritis provocada de esta forma. Aunque se activa en el huésped una respuesta inmunitaria de la mucosa polarizada por Th1 predominante, la respuesta inmunitaria no es suficiente para generar inmunidad protectora contra *H. pylori*, lo que tiene como consecuencia infecciones crónicas y el desarrollo de patologías gástricas en determinados pacientes. Estudios previos han revelado que los lisados de *H. pylori* pueden inhibir la proliferación de células T inducida por mitógenos, lo que indica que existen determinados factores en el lisado relacionados con las actividades inmunosupresoras. Dichos factores atenúan la actividad de las células T, independientemente de los genes de virulencia bacteriana CagA y VacA. Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo la *H. pylori* suprime directa o indirectamente la inmunidad mediada por células T: la *H. pylori* podría inhibir la proliferación de células T y la expresión de TCR por la arginasa, estimular la liberación de la citocina inhibidora TGF- β , interferir con la presentación invariante de antígeno dependiente de la cadena a través de VacA, regular negativamente las funciones de DC a través de la fosforilación de CagA o suprimir la fagocitosis por fagocitos profesionales a través de VirB7 y VirB11.

A pesar de la posible implicación de los mecanismos mencionados anteriormente, las células T reguladoras (células Treg) se consideran actualmente los principales componentes reguladores en la inhibición de la actividad de las células T y en el equilibrio de la inflamación y la persistencia bacteriana. En 2003 se informó que las células T CD4⁺CD25⁺ estaban implicadas en la inmunopatología y la colonización inducidas por *H. pylori*. Investigaciones posteriores mostraron que las células Treg del huésped son cruciales para proteger un huésped de *H. pylori* infectado frente a la inflamación gástrica excesiva y síndromes patológicos, al mismo tiempo que promueven la colonización bacteriana en la mucosa gástrica y duodenal. Además, la expresión de B7-H1 por células epiteliales gástricas promueve el desarrollo de células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ tras la exposición a *H. pylori*, lo que indica que este patógeno promueve la inducción de células Treg del huésped. Estudios posteriores examinaron las funciones de estas células Treg inducidas por *H. pylori* y demostraron que pueden suprimir la actividad o inducir la anergia de células T efectoras específicas de *H. pylori*. Adicionalmente, la gastritis inducida por *H. pylori* se asocia con un reclutamiento de células Treg FoxP3⁺ de origen natural que se correlaciona con el grado de colonización bacteriana y la expresión de TGF- β 1 de la mucosa. Estos hallazgos, en conjunto, indican que las respuestas de Treg del huésped inducidas por infección por *H. pylori* son reguladores importantes de la respuesta inmunitaria a *H. pylori* y están involucradas en la patogénesis de enfermedades relacionadas con *H. pylori*.

La proteína de choque térmico 60 de *H. pylori* (HpHSP60) puede inducir la expresión de citocinas proinflamatorias y TGF- β 1 en monocitos. Se ha informado que HpHSP60 se expresa en la pared celular bacteriana, asociada con la ureasa, y puede funcionar como una molécula adhesiva para las células epiteliales gástricas. Además, se ha descubierto que la administración de un anticuerpo anti-HSP60 interfiere con el crecimiento de *H. pylori*. Por lo tanto, la HpHSP60 no es solo un factor esencial para la viabilidad de *H. pylori*, sino que también es un producto importante que facilita la colonización del estómago humano. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que la HpHSP60 actúa como un potente inmunógeno que conduce a una fuerte inducción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α , IL-8 e IL-6. Estas citocinas determinan la inflamación en el sitio de la infección, y dicha inflamación inducida por HpHSP60 podría tener el potencial de promover procesos de tumorigénesis maligna, incluyendo angiogénesis y metástasis. La HpHSP60 es también un importante factor de virulencia para la infección por *H. pylori* en un huésped humano.

En conjunto, la relación entre las células HpHSP60 y Treg es intrigante y merece más investigaciones. No obstante, la mayor parte de las investigaciones realizadas en el pasado se centran en la inflamación inducida por HpHSP60. Muy pocas investigaciones hablaron sobre la relación entre HpHSP60 y las reacciones inmunosupresoras expresadas en un huésped.

La patente de Estados Unidos N° 6.403.099 divulga compuestos conjugados que comprenden una proteína de choque térmico y un oligosacárido o polisacárido capsular. Los compuestos son capaces de inducir la formación de anticuerpos antipolisacáridos. La proteína de choque térmico incluye una proteína de choque térmico de *H. pylori*.

La publicación de Hiroyuki Yamaguchi et al. ("Growth Inhibition of *Helicobacter pylori* by Monoclonal Antibody to Heat-Shock Protein 60", *Microbiology and Immunology*, vol. 41, N° 12, 14 de diciembre de 1997 (14/12/1997), páginas 909-916, XP055292141) divulga el uso de un anticuerpo contra HSP60 para inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*, pero sin divulgar la secuencia de aminoácidos del anticuerpo.

La publicación de Shigeru Kamiya et al. ("Immune response to heat shock protein of *Helicobacter pylori* - a candidate as a vaccine component", *Keio Journal of Medicine*, vol. 51, suplemento N° 2, 1 de enero de 2002 (01/01/2002), páginas 24-25, XP022245355) también divulga el uso de un anticuerpo contra HSP60 para inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*, en la que el anticuerpo H9 está cartografiado con respecto a los aminoácidos 189-203 de hpHSP60.

Sumario de la invención

Según la presente invención, determinados patógenos son capaces de suprimir la inmunidad de sus huéspedes. Dichas funciones inmunosupresoras las proporcionan especialmente sustancias inmunosupresoras secretadas o producidas por los patógenos. Es posible bloquear las funciones inmunosupresoras de los patógenos desactivando las funciones de las sustancias inmunosupresoras. Como las funciones inmunosupresoras se han desactivado, las actividades de inmunidad del huésped no se suprimen. Las funciones de inmunidad no suprimidas o aumentadas del huésped son capaces de reducir o incluso eliminar los patógenos.

Los inventores han descubierto un anticuerpo monoclonal novedoso que inhibe significativamente las funciones o las sustancias inmunosupresoras de patógenos particulares. Sobre la base de este descubrimiento se inventan el anticuerpo monoclonal de la presente invención, su fragmento de unión a antígeno, los hibridomas para producir dichos anticuerpos, así como sus procedimientos de preparación.

Por consiguiente, un objetivo de la invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal novedoso. El anticuerpo monoclonal inhibe significativamente las funciones inmunosupresoras de patógenos particulares.

Otro objetivo de la presente invención es también proporcionar un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal, así como hibridomas que generan dicho anticuerpo.

También se proporcionan procedimientos para la preparación del anticuerpo monoclonal, su fragmento de unión al antígeno y los hibridomas que generan dicho anticuerpo.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar el anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno para su uso en el tratamiento de infecciones por *H. pylori*, en el que el anticuerpo inhibe funcionalmente las funciones inmunosupresoras de *H. pylori*.

Según un aspecto para la presente invención, el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno del mismo se pueden combinar con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por MEKVGKDGVTVE (SEQ ID NO: 1), tal como se define también en la reivindicación 1 o 7.

La presente invención también proporciona hibridomas capaces de producir el anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno.

El anticuerpo monoclonal de la invención expresa efectos inhibidores significativos contra las actividades inmunosupresoras de patógenos particulares y es útil para bloquear un fenómeno inmunosupresor causado por los patógenos. En determinadas formas de realización de la presente invención, la función inmunosupresora de los patógenos la proporciona una sustancia inmunosupresora secretada o producida por los patógenos. En dichas formas de realización, el anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno de la presente invención elimina principalmente los patógenos mediante la inhibición de las funciones inmunosupresoras de los patógenos y, por lo tanto, mediante la activación de respuestas inmunitarias del huésped de los patógenos.

Según un aspecto de referencia, se proporcionan procedimientos para la preparación de un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno, e hibridomas capaces de producir el anticuerpo o los fragmentos, comprendiendo el procedimiento: utilizar un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por MEKVGKDGVTVE (SEQ ID NO: 1) como un antígeno que provoca que un mamífero genere una respuesta inmunitaria al antígeno; obtener una célula inmunitaria del mamífero inmunizado contra los patógenos y fusionar la célula inmunitaria obtenida con una célula de mieloma de mamífero para producir un hibridoma; clonar el hibridoma obtenido para obtener un hibridoma deseado. El procedimiento puede comprender además las etapas de: utilizar el hibridoma obtenido para producir anticuerpos; y recolectar los anticuerpos producidos por el hibridoma.

En dicho procedimiento, la célula inmunitaria incluye una célula del bazo.

El anticuerpo monoclonal inventado o su fragmento de unión a antígeno se pueden utilizar directamente o como una composición farmacéutica que incluye aditivos farmacéuticamente aceptables, etc. Según una forma de realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica y esta comprende un anticuerpo monoclonal, o antígeno fragmento de unión del mismo, de la presente invención. Según otra forma de realización de la presente invención, la composición farmacéutica se utiliza como un inhibidor funcional contra sustancias inmunosupresoras particulares. Además, la presente invención también proporciona el anticuerpo monoclonal inventado para su uso en el tratamiento de infecciones por *H. pylori*, anticuerpo que inhibe funcionalmente las funciones inmunosupresoras de *H. pylori*.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra resultados experimentales sobre efectos de HpHSP60 en la proliferación de PBMC.

La figura 2 muestra resultados experimentales sobre efectos de HpHSP60 en la proliferación de células T.

Las figuras 3A-3C muestran respectivamente resultados experimentales sobre efectos de HpHSP60 en los ciclos celulares PBMC.

La figura 4 muestra resultados experimentales sobre la inducción *in vitro* de células Treg por HpHSP60.

La figura 5 muestra resultados experimentales sobre efectos de HpHSP60 en la proliferación de células Treg.

La figura 6 muestra resultados experimentales sobre efectos de células Treg inducidas por HpHSP60 en la proliferación de células T.

La figura 7 muestra resultados experimentales sobre la inhibición del crecimiento de *H. pylori in vivo* debida al bloqueo de las funciones inmunosupresoras de HpHSP60.

La figura 8 muestra resultados de otro experimento sobre la inhibición del crecimiento de *H. pylori in vivo* debida al bloqueo de las funciones inmunosupresoras de HpHSP60.

La figura 9 muestra resultados experimentales sobre la inhibición de células Treg debida al bloqueo de las funciones inmunosupresoras de HpHSP60.

La figura 10 muestra resultados experimentales sobre la secuencia activa en HpHSP60 que induce el crecimiento de células Treg.

La figura 11 muestra la cuantificación de los resultados experimentales mostrados en la figura 10.

La figura 12 muestra resultados experimentales en un estudio del mecanismo inmunológico de anticuerpos anti-HpHSP60.

La figura 13 muestra resultados experimentales sobre efectos de anticuerpos anti-HpHSP60 en las expresiones de células Treg en la mucosa gástrica de ratones.

La figura 14 muestra resultados experimentales sobre efectos de anticuerpos anti-HpHSP60 en las expresiones de IL-10 en la mucosa gástrica de ratones.

La figura 15 muestra resultados experimentales sobre el reconocimiento de fragmentos HpHSP60 por el anticuerpo LHP-1 (9E4).

La figura 16 muestra resultados de experimentos adicionales sobre el reconocimiento de fragmentos de HpHSP60 por el anticuerpo LHP-1 (9E4).

55 Descripción detallada de la invención

Aunque no se pretende limitar la presente mediante ninguna teoría, según la presente invención, determinados patógenos son capaces de suprimir la inmunidad de sus huéspedes secretando o produciendo sustancias inmunosupresoras para proliferar o para causar enfermedades al huésped. Los ejemplos de dichos patógenos incluyen *H. pylori* y otras bacterias similares tales como *Helicobacter felis* y *Arcobacter suis*. Los inventores han descubierto que la proteína de choque térmico es una de esas sustancias inmunosupresoras. Según formas de realización de la presente invención, la proteína de choque térmico 60 de *H. pylori* (HpHSP60) es capaz de reaccionar con monocitos para estimular la producción de hormonas inmunosupresoras, tales como IL-10 y TGF- β , e inducir la proliferación de células Treg. Como resultado, la inmunidad del huésped se suprime, lo que hace que el huésped no pueda resistir las infecciones crónicas por *H. pylori*.

La presente invención ha desarrollado un procedimiento novedoso para aumentar la inmunidad de los huéspedes. Se utiliza un inhibidor de la función que bloquea las funciones de las sustancias inmunosupresoras para inactivar las funciones de las sustancias inmunosupresoras. La proliferación de las células Treg se inhibe así eficazmente y se elimina la respuesta inmunosupresora del huésped.

Los inventores han descubierto un anticuerpo monoclonal novedoso que inhibe significativamente las funciones o las sustancias inmunosupresoras de patógenos particulares. El anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión a antígeno pueden utilizarse, así como el inhibidor funcional que es capaz de identificar la sustancia inmunosupresora o un fragmento de la misma y bloquear las funciones de la sustancia inmunosupresora.

Depósito

El anticuerpo LHP-1 (9E4) se generó utilizando la secuencia de aminoácidos de las posiciones 101 a 200 de HpHSP60 como antígeno. Los hibridomas que incluyen este anticuerpo, LHP-1 (9E4), se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC®), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110, Estados Unidos, designación ATCC: PTA-122900. La fecha de depósito es el 03/02/2016.

Anticuerpos monoclonales e hibridomas

El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno de la presente invención se une a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por MEKVGKDGVTVE (SEQ ID NO: 1) y es capaz de inhibir eficazmente las reacciones inmunosupresoras inducidas por patógenos particulares. Las funciones inmunosupresoras de los patógenos son proporcionadas por una sustancia inmunosupresora secretada o producida por los patógenos. El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno de la presente invención elimina principalmente los patógenos inhibiendo las funciones inmunosupresoras de los patógenos y, por lo tanto, activando las respuestas inmunitarias del huésped de los patógenos. El anticuerpo monoclonal de la invención o su fragmento de unión a antígeno expresa actividades de inhibición funcional significativas contra las funciones inmunosupresoras inducidas por los patógenos, con efectos inesperados.

Según una forma de realización de la presente invención, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno reconoce un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por MEKVGKDGVTVE (SEQ ID NO: 1).

El anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de la presente invención contiene una cadena pesada y/o una cadena ligera. Cada cadena ligera y cada cadena pesada puede incluir una región variable en sus extremos N-terminales y zonas alternas que incluyen 4 regiones de marco estructural (FR) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en cada una de las regiones variables.

En una forma de realización de la invención, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno puede incluir en una región variable de la cadena ligera: una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por ASQSVDDYDGDVFL (SEQ ID NO: 2), una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por YAASN (SEQ ID NO: 3) y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por QSNEVPWT (SEQ ID NO: 4). En la presente invención, una región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por las posiciones 21-131 de la SEQ ID NO: 6.

En algunas formas de realización de la invención, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno comprende en una región variable de la cadena pesada: una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por GYNMN (SEQ ID NO: 7), una CDR21 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por NINPYYGSTS YNQKFKG (SEQ ID NO: 8) y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SPYYSNYWRYFDY (SEQ ID NO: 9). En la presente invención, una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por las posiciones 20-141 de la SEQ ID NO: 11.

En otra forma de realización preferida de la presente invención, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno comprende regiones variables de cadena ligera y regiones variables de cadena pesada. Una región variable de la cadena ligera comprende: una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por ASQSVDDYDGDVFL (SEQ ID NO: 2), una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por YAASN (SEQ ID NO: 3) y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por QSNEVPWT (SEQ ID NO: 4); y una región variable de la cadena pesada comprende: una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por GYNMN (SEQ ID NO: 7), una CDR21 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por NINPYYGSTS YNQKFKG (SEQ ID NO: 8) y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SPYYSNYWRYFDY (SEQ ID NO: 9).

En la presente invención, el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en el que la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por las posiciones 21-131 de la SEQ ID NO: 6 y la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por las posiciones 20-141 de la SEQ ID NO: 11.

Según las formas de realización de la presente invención, el anticuerpo monoclonal es preferentemente un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

- 5 En las formas de realización preferidas de la invención, el fragmento de unión a antígeno puede ser Fab, Fab', (Fab')₂, Fv o scFv. El isotipo de inmunoglobulina puede ser IgG1, IgG2, IgG4, IgA, IgE o IgD.

10 La presente invención también proporciona un hibridoma para producir el anticuerpo monoclonal de la presente invención, o su fragmento de unión a antígeno. En las formas de realización preferidas de la invención, el hibridoma es el hibridoma 9E4.

15 El anticuerpo monoclonal y su fragmento de unión a antígeno, así como el hibridoma de la invención, se pueden preparar según las etapas siguientes: utilizar un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por MEKVGKDGVTVE (SEQ ID NO: 1) como un antígeno para provocar que un mamífero genere una respuesta inmunitaria al antígeno; obtener una célula plasmática (célula inmunitaria) del mamífero inmunizado contra los patógenos y fusionar la célula inmunitaria obtenida con una célula de mieloma de mamífero para producir un hibridoma; clonar el hibridoma obtenido para obtener el hibridoma deseado. Este procedimiento puede comprender adicionalmente las etapas siguientes: utilizar el hibridoma obtenido para producir anticuerpos; y recolectar los anticuerpos producidos por el hibridoma.

20 En el procedimiento descrito anteriormente, el procedimiento de inmunización de un mamífero puede ser cualquier procedimiento de administración conocido en la técnica. Los procedimientos adecuados incluyen: inyección intraperitoneal, inyección en el bazo, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intradérmica, administración oral, administración en la mucosa, administración transdérmica y similares. De entre los mismos, se prefieren la inyección intraperitoneal y la inyección en el bazo. Los intervalos de administración del antígeno se pueden determinar según la cantidad total de antígeno administrado, la especie de los mamíferos y otras condiciones, tales como de varias veces al mes.

25 El mamífero inmunizado no está limitado a especies particulares. No obstante, se debe elegir teniendo en cuenta condiciones tales como la compatibilidad de las células de mieloma utilizadas en la fusión celular. Los mamíferos adecuados incluyen ratones, ratas y hámsteres. De entre los mismos, se prefieren los ratones.

Las células inmunitarias son preferentemente células del bazo, pero esto no representa ninguna limitación técnica.

35 Las células inmunitarias se fusionan con células de mieloma, utilizando cualquiera de los procedimientos conocidos. Los procedimientos adecuados incluyen uno propuesto por Milstein et al. (Methods Enzymol., 73, 3-46, 1981). El procedimiento comprende las etapas siguientes: en presencia de un acelerador de la fusión, mezclar las células inmunitarias con células de mieloma en un medio de cultivo. Se añaden medios de cultivo adicionales de forma apropiada en el proceso de fusión celular. Separar por centrifugación repetidamente para obtener hibridomas.

40 Los medios de cultivo adecuados para su uso en la fusión celular incluyen: medio RPMI-1640, medio MEM y similares. Estos medios se utilizan a menudo en la fusión celular. En el proceso de fusión se pueden añadir suplementos tales como suero, por ejemplo, suero de ternera fetal, cuando sea apropiado.

45 En general, la temperatura para la fusión celular es preferentemente de 25 a 37 °C, más preferentemente de 30 a 37 °C. La relación de las células inmunitarias y las células de mieloma se encuentra preferentemente entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:10.

50 Los aceleradores de la fusión adecuados incluyen: polietilenglicol (PEG), virus Sendai (HVJ) y similares. De entre los mismos, se prefiere el PEG. Si se utiliza PEG, su peso molecular puede seleccionarse apropiadamente, por ejemplo, de un peso molecular promedio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 6.000. Además, la concentración del PEG en el medio puede variar de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 60% (p/v).

55 En el procedimiento descrito anteriormente, los hibridomas se pueden elegir con las etapas siguientes: hibridomas obtenidos por fusión celular se cultivan en un medio de cultivo. El medio es preferentemente un medio selectivo, tal como medio HAT y otros medios disponibles comercialmente. Se utiliza un procedimiento de dilución limitante para seleccionar los hibridomas obtenidos, utilizando, por ejemplo, valores de anticuerpos de péptido que incluyen una secuencia de aminoácidos representada por MEKVGKDGVTVE (SEQ ID NO: 1) como indicador. El tiempo de cultivo debe ser lo suficientemente largo como para causar la muerte de células distintas de los hibridomas diana y generalmente es de varios días a varias semanas. Los hibridomas obtenidos a partir de estas etapas pueden proporcionarse para subcultivo en medio de cultivo convencional, o para su conservación a largo plazo en nitrógeno líquido.

65 En el procedimiento, la recolección del anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión a anticuerpos de la presente invención comprende las etapas siguientes: utilizar un procedimiento conocido para cultivar los hibridomas; y obtener anticuerpos monoclonales del sobrenadante de su cultivo. Otro procedimiento incluye las etapas siguientes:

administrar los hibridomas a mamíferos adaptables a los hibridomas para lograr la proliferación de los hibridomas; y obtener anticuerpos monoclonales a partir de ascitis del mamífero. Entre los procedimientos aplicables, la obtención de anticuerpos monoclonales a partir del sobrenadante de cultivo produce una mayor pureza de anticuerpos, mientras que la obtención de anticuerpos monoclonales a partir de ascitis permite la producción en masa de anticuerpos. Los expertos en la técnica pueden elegir adecuadamente un procedimiento según el propósito de la recolección.

Los anticuerpos monoclonales o el fragmento de unión a antígeno de los mismos obtenido a partir de las etapas anteriores pueden purificarse adicionalmente. El proceso de purificación puede ser cualquiera de los procedimientos conocidos, por ejemplo, fraccionamiento en sal, filtración en gel, cromatografía de afinidad y similares.

Los anticuerpos monoclonales de la invención y su fragmento de unión a antígeno realizan importantes efectos de inhibición funcional contra las funciones inmunosupresoras de los patógenos. Respecto a su administración, el anticuerpo monoclonal de la invención o sus fragmentos de unión a antígeno pueden administrarse directamente, o como una composición farmacéutica que incluye aditivos farmacéuticamente aceptables, etc. Según la presente invención, la composición farmacéutica comprende una dosis eficaz del anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención. La composición farmacéutica puede utilizarse como un inhibidor funcional contra funciones inmunosupresoras de patógenos particulares. En el presente documento, también se proporciona el uso del anticuerpo monoclonal de la invención, que se incluye en la preparación de una composición farmacéutica.

La composición farmacéutica de la presente invención es una composición que comprende un inhibidor de función que inhibe las funciones inmunosupresoras y se prepara mediante las etapas siguientes: diluir o suspender el anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno de la presente invención en una solución salina fisiológica, agua destilada, o una solución tampón tal como un líquido tampón de inyección; y modularlo para obtener la composición. La composición inhibidora de la función inmunosupresora de la presente invención puede comprender otros aditivos. Los aditivos adecuados incluyen: disolventes, coadyuvantes de disolución, conservantes, estabilizantes, emulsionantes, agentes de suspensión, agentes calmantes, agentes isotónicos, tampones, excipientes, agentes espesantes, agentes colorantes y vehículos convencionales tales como varios ribosomas, vehículos de poliaminoácidos, polímeros sintéticos, polímeros naturales, etc.

Según la presente invención, se proporcionan medios para suprimir las supresiones inmunitarias causadas por la proteína de choque térmico 60 secretada por agentes patógenos tales como *H. pylori* u otras bacterias similares. Después de que se administra a un huésped vivo el anticuerpo monoclonal de la presente invención o su fragmento de unión a antígeno, se inhiben las supresiones inmunitarias causadas por la proteína de choque térmico 60 de los patógenos, por lo que se activa el sistema inmunitario del huésped vivo y los patógenos se eliminan.

En la invención, el anticuerpo monoclonal de la presente invención o su fragmento de unión a antígeno puede administrarse al huésped sistémicamente o localmente. El procedimiento de administración incluye cualquiera de los procedimientos conocidos, por ejemplo, goteo, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intradérmica, administración oral, administración en la mucosa, administración transdérmica y similares.

La cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal de la invención o de su fragmento de unión a antígeno no representa ninguna limitación técnica. Los expertos en la técnica pueden determinar adecuadamente según el tipo, naturaleza, sexo y edad, etc. del huésped.

A continuación, se describirán determinados ejemplos haciendo referencia a los dibujos para ilustrar el anticuerpo monoclonal que inhibe funciones inmunosupresoras de patógenos, el fragmento de unión a antígeno del mismo y los hibridomas que producen dicho anticuerpo, de la presente invención. Sin embargo, se apreciará que el alcance de la presente invención no se limita a ninguna de las formas de realización descritas. Por ejemplo, aunque en la descripción detallada se utilizan el mecanismo de patogénesis de *H. pylori* y el inhibidor funcional para HpHSP60 como ejemplos en la descripción de la invención, la proteína de choque térmico de otras bacterias, tales como *Helicobacter felis* (causa conocida de enteritis crónica) y *Arcobacter suis* (causa conocida de enfermedad periodontal), también incluyen un fragmento idéntico de HpHSP60, tal como HSP 60 101-200. Por lo tanto, el anticuerpo de la presente invención también es útil en estas y otras bacterias patogénicas y otros patógenos que poseen un mecanismo de patogénesis similar.

Forma de realización 1: Cultivo celular y aislamiento de PBMC y células T

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de donantes sanos por centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y se resuspendieron en RPMI-1640 con suero de ternera fetal inactivado al 10% y penicilina-estreptomina al 1%. Para el agotamiento de monocitos, se cultivaron PBMC en placas de 10 cm a una densidad de 10^6 /ml durante toda la noche para adherir monocitos. Las células suspendidas se recogieron después por centrifugación a 1500 rpm durante 15 min. Las células T totales se aislaron de PBMC mediante selección negativa utilizando un dispositivo de clasificación magnética (Miltenyi Biotec, MA, Estados Unidos). En resumen, las PBMC se incubaron con un cóctel de anticuerpos conjugados con biotina,

seguido de anticuerpo Ab anti-biotina conjugados con microperlas para el agotamiento magnético. Las células T se eluyeron según los protocolos del fabricante.

Forma de realización 2: El efecto de HpHSP60 sobre la proliferación de PBMC

La proliferación de PBMC estimuladas con anticuerpo monoclonal mAb anti-CD3 tratadas con HpHSP60, rGFP o HpHSP60 hervida a diferentes dosis se supervisó mediante un ensayo de proliferación celular. Para medir la proliferación celular, se sembraron 0,2 ml de células a 1×10^6 células/ml en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos recubierta previamente con mAb anti-CD3. La proliferación celular se determinó mediante un ensayo MTT después de 96 horas. Los resultados se muestran en la figura 1: resultados experimentales sobre los efectos de HpHSP60 en la proliferación de PBMC. Los datos que se muestran en la misma se comunican como el índice de proliferación.

El índice de proliferación celular se calculó de la forma siguiente: índice de proliferación (100%) = $(DO_{595}$ de las células tratadas con anti-CD3+HpHSP60)/(DO₅₉₅ de las células tratadas con anti-CD3)*100%. Los resultados que difieren significativamente del grupo no tratado se indican mediante * ($p < 0,05$) ($n = 15$).

En la figura 1, (◆) muestra que se inhibe la proliferación de células T, después de añadir HpHSP60 a las PBMC. (■) muestra que rGFP, al ser una proteína de control en este sistema experimental, no influye en la proliferación de células T. Los resultados de esta unidad de control muestran que ninguna proteína es capaz de inhibir la proliferación de células T. (▲) representa HpHSP60 hervida, que incluye la secuencia de HpHSP60, aunque su estructura proteica ha sido destruida. Los resultados muestran que la HpHSP60 hervida no influye en la proliferación de células T.

Forma de realización 3: Influencia de HpHSP60 sobre la proliferación de células T en PBMC

Después del tratamiento con mAb anti-CD3, las PBMC se trataron con o sin HpHSP60 (200 ng). Las células T o las células que no son T en PBMC se identificaron mediante tinción con marcador de superficie CD3. El número de células se calculó por medio de un análisis mediante citómetro de flujo.

Para la tinción del marcador de superficie CD3, las células se recogieron y se tiñeron con 1 µg de mAb IgG de ratón anti-CD3 humano (OKT3), seguido de 0,5 µg de Ab secundarios de conejo anti-IgG de ratón-FITC (Biolegend, CA, Estados Unidos). Para la tinción intracelular con FoxP3, las células se cosecharon y se tiñeron con mAb de ratón anti-CD4 humano-FITC (Biolegend, CA, Estados Unidos) antes de la fijación y la permeabilización, seguida de tinción intracelular con mAb de ratón anti-FoxP3 humano-PE (BD Biosciences, MA, Estados Unidos) según el protocolo del fabricante. Para el ensayo del ciclo celular, las células se cosecharon después de 72 horas y 10^6 células se fijaron con etanol helado al 70%. El ADN se tiñó con tampón de tinción de ADN (5% Triton-X 100, 0,1 mg/ml de RNasa A y 4 µg/ml de yoduro de propidio) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se detectaron cambios en el contenido de ADN. La fluorescencia se analizó utilizando un citómetro de flujo FACS (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) y el programa informático CELLQuest Pro (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Los resultados se muestran en la figura 2: resultados experimentales sobre efectos de HpHSP60 en la proliferación de células T.

En la figura 2, el índice de proliferación se calcula como: índice de proliferación (veces) = (número de células T o no T en el grupo tratado con anti-CD3/HpHSP60)/(número de células T o no T en el control no tratado). Una diferencia significativa se indica mediante * ($p < 0,05$) ($n = 4$). Los resultados muestran que HpHSP60 es capaz de inhibir la proliferación de células T. En esta figura, (□) representa células T en PBMC. (■) representa células no T en PBMC. Claramente, lo que inhibe HpHSP60 es la proliferación de células T.

Forma de realización 4: Efectos de HpHSP60 sobre el ciclo celular

Se determinaron los efectos de HpHSP60 sobre el ciclo celular de PBMC. De los productos de PBMC de la forma de realización 3, se obtienen PBMC solas, PBMC activadas con CD3 y PBMC tratadas con anti-CD3 y HpHSP60 respectivamente. Los porcentajes de células en las fases sub-G1, G1, S y G2/M se observan y se presentan en gráficos de histograma, tal como se muestra en las figuras 3A-3C. Las figuras 3A-3C muestran respectivamente resultados experimentales de los efectos de HpHSP60 sobre los ciclos celulares de PBMC. Las figuras son representativas de tres replicados.

Las figuras 3A-3C muestran que HpHSP60 inhibe la proliferación de células T, en lugar de causar su muerte. La figura 3A muestra que las células T sin activación por CD3 (célula sola) permanecen en sus fases latentes (G0/G). La figura 3B muestra que, después de la activación por CD3, se activó el crecimiento de las células T y se formaron los gráficos típicos del ciclo celular. La figura 3C no muestra diferencias sustanciales con la figura 3B. Las PBMC tratadas con anti-CD3 y HpHSP60 (Anti-CD3 + HpHSP60) muestran la misma proporción en las fases sub G0/G1 (que representa la muerte de las células) que la del grupo Anti-CD3. Los resultados experimentales muestran que el papel de HpHSP60 es inhibir el crecimiento de las células T, en lugar de provocar su muerte.

Forma de realización 5: Resultados de la inducción *in vitro* de células Treg por HpHSP60

5 Las proporciones de células CD4⁺FoxP3⁺ en PBMC tratadas con HpHSP60 se midieron a lo largo del tiempo. Una diferencia significativa en comparación con el control anti-CD3 está indicada mediante $^*(p < 0,05)$ (n = 5). Los resultados se muestran en la figura 4: resultados experimentales de la inducción *in vitro* de células Treg por HpHSP60.

10 Dado que CD4 y FoxP3 son marcadores para las células Treg, es posible identificar los efectos de HpHSP60 en el crecimiento de las células T de la figura 4. En esta figura, "(•) célula sola" expresa la curva de crecimiento original de las células T. "(■) anti-CD3" expresa la curva de crecimiento de las células T activadas por CD3. "(▲) Anti-CD3 + HpHSP60" muestra una proliferación significativa de células T. Los resultados experimentales muestran que HpHSP60 es capaz de mejorar la proliferación de células Treg.

Forma de realización 6: HpHSP60 potencia la proliferación de células Treg

15 Tras la forma de realización 5, las células se cosecharon después de 72 horas para realizar el aislamiento de ARN total. Se utilizó una PCR en tiempo real para medir la expresión de ARNm de *FoxP3*. Una diferencia significativa en comparación con el control anti-CD3 se indica mediante $^*(p < 0,05)$ (n = 4). Los resultados se muestran en la figura 5: resultados experimentales sobre efectos de HpHSP60 en la proliferación de células Treg.

20 Dado que FoxP3 es un marcador para las células Treg, cuando las células Treg están activadas, la expresión de FoxP3 también aumenta. Los resultados del ensayo de ARNm de la figura 5 muestran que, después de la adición de HpHSP60, la expresión de FoxP3 aumenta significativamente. Este experimento apoya aún más el hecho de que añadir HpHSP60 potencia la proliferación de células Treg.

25 Forma de realización 7: La actividad de células Treg inducidas por HpHSP60 en la proliferación de células T

30 Se utiliza un ensayo funcional para medir la actividad de las células Treg inducidas por HpHSP60 en la proliferación celular. Los resultados se muestran en la figura 6. La figura 6 muestra resultados experimentales sobre los efectos de células Treg inducidas por HpHSP60 en la proliferación de células T. Los números en los gráficos de histograma indican el porcentaje de células proliferativas. El gráfico de histograma es representativo de tres replicados.

35 Los resultados experimentales muestran que, cuando aumenta el número de células Treg, las actividades de las células T se inhiben correspondientemente. Esto prueba que cuando se añade HpHSP60 a la PBMC, las actividades de las células T se inhiben, debido al aumento de las células Treg.

Forma de realización 8: Preparación de suero anti-HpHSP60 y anticuerpos monoclonales contra HpHSP60

40 Se adquirieron ratones C3H/HeN del National Laboratory Animal Breeding and Research Center, Taipei, Taiwan, y se mantuvieron en aisladores exentos de patógenos. Todos los alimentos, agua, jaulas y ropa de cama se esterilizaron antes de su uso. A los ratones machos de 5 semanas de edad se inyectó i.v. HpHSP60 para generar reacciones de inmunización. Después del recuerdo repetido de HpHSP60, se recoge la sangre de los ratones. Se aísla suero para obtener suero que contiene anticuerpo anti-HpHSP60, denominado "suero anti-HpHSP60". Los productos de esta etapa son el anticuerpo policlonal.

45 Las células del bazo de los ratones se fusionaron con células de mieloma de ratón para formar un hibridoma. Los productos se analizan adicionalmente mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) para aislar anticuerpos específicos.

50 Las líneas celulares resultantes se diluyeron y se redistribuyeron en una placa de cultivo celular con 96 pocillos. Se realiza un cálculo para asegurarse de que cada pocillo contenga solo una célula. Después de que las células crecen para formar colonias, las colonias se criban de nuevo por ELISA para obtener anticuerpos específicos. Se obtienen así anticuerpos monoclonales.

Forma de realización 9: Evaluación de la erradicación de *H. pylori* por bloqueo de HSP60 *in vivo*

55 Se adquirieron ratones C3H/HeN del National Laboratory Animal Breeding and Research Center, Taipei, Taiwan, y se mantuvieron en aisladores exentos de patógenos. Todos los alimentos, agua, jaulas y ropa de cama se esterilizaron antes de su uso. A los ratones machos de 5 semanas de edad se inyectaron i.v. 0,1 ml de suero anti-HSP60 obtenido de la forma de realización 8 antes de la inoculación de *H. pylori*. A las 24 horas después del tratamiento antisuero, se inyectaron a los ratones 0,5 ml de *H. pylori* vivos (cepa ATCC 15415, aproximadamente 10⁹ unidades formadoras de colonias) en caldo BHI mediante sonda oral dos veces en un periodo de 3 días. Una vez establecida la infección por *H. pylori*, se inyectaron a los ratones i.v. 0,1 ml de suero anti-HSP60 cada 3 días.

65 A las 8 semanas después la inoculación de *H. pylori*, todos los ratones se sacrificaron asépticamente y los estómagos intactos se abrieron a lo largo de la curvatura menor. Cada estómago se diseccionó en dos especímenes longitudinales iguales, que contenían el cuerpo gástrico y el antro. La erradicación de *H. pylori* se analizó mediante recultivo de *H. pylori* y tinción inmunohistoquímica para determinar la expresión de FoxP3.

Los resultados se presentan como la media \pm SEM. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba t de Student de una cola; $p < 0,05$ se consideró significativo. Los resultados se muestran en las figuras 7, 8 y 9. Entre las mismas, las figuras 7 y 8 muestran respectivamente resultados de varios experimentos sobre la inhibición del crecimiento de *H. pylori in vivo* debida al bloqueo de las funciones inmunosupresoras de HpHSP60. La figura 9 muestra resultados experimentales sobre la inhibición de células Treg debida al bloqueo de las funciones inmunosupresoras de HpHSP60.

Las figuras 7 y 8 muestran que el suero anti-HpHSP60 reduce significativamente el recultivo de colonias de *H. pylori* a partir de un lisado de tejido gástrico en la 8ª semana después de la inoculación de *H. pylori*. Para determinar el mecanismo de disminución de la colonia por anticuerpos, se evaluó la expresión de células Treg en tejidos gástricos infectados con *H. pylori*. La figura 9 revela que los tratamientos con suero anti-HpHSP60 reducen significativamente la expresión de células Treg en la mucosa gástrica. Estos resultados indican que la infección por *H. pylori* crónica está correlacionada con HpHSP60 y que el bloqueo de HpHSP60 puede disminuir la colonización por *H. pylori* y la generación de células Treg.

Forma de realización 10: Posiciones de la secuencia inducible por células Treg en HpHSP60

Para asignar la posición de la secuencia activa en HpHSP60 que induce células Treg, se preparan mAb anti-HpHSP60 que reconocen la secuencia completa o fragmentos de HpHSP60. Se utiliza el procedimiento de la forma de realización 9. Después de un tratamiento de 24 h con el suero anti-HpHSP60, los ratones se infectaron con *H. pylori*, estableciéndose así la infección por *H. pylori*. A los ratones se les inyectaron después i.v. 0,1 ml de PBS, suero, suero anti-HSP60, mAb LHP-1 (9E4) y mAb LHP-2 (5A8), respectivamente, cada 3 días. Los ratones se sacrificaron después de 8 semanas. La pared gástrica se trituró y los homogeneizados gástricos obtenidos se incubaron en medio de aislamiento de *H. pylori* incubada (agar EYE), para confirmar parásitos de *H. pylori* en el estómago. Los resultados se muestran en la figura 10: resultados experimentales sobre la secuencia activa en HpHSP60 que induce el crecimiento de células Treg.

Tal como se muestra en la figura 10, las manchas rojas en la placa son colonias de *H. pylori*. Este experimento revela que, mientras que el suero anti-HpHSP60 inhibe el crecimiento de *H. pylori*, el anticuerpo LHP-1 (9E4) es capaz de eliminar completamente *H. pylori*.

Se determinó el número de colonias de *H. pylori* (UFC) contando las colonias rojas en la placa EYE. Una diferencia significativa se indica mediante $^*(p < 0,05)$. Los resultados se muestran en la figura 11. La figura 11 muestra la cuantificación de los resultados experimentales mostrados en la figura 10. Tal como se muestra en la figura 11, se eliminó por completo *H. pylori* después de añadir el anticuerpo LHP-1 (9E4).

Forma de realización 11: Mecanismos inmunológicos del anticuerpo anti-HpHSP60

Para comprender los mecanismos inmunológicos del anticuerpo anti-HpHSP60, se midió la actividad de ureasa gástrica de los ratones según la forma de realización 10 en la 2ª, 3ª y 8ª semana después de la inoculación de *H. pylori*. La actividad de ureasa se normaliza a la actividad de ureasa gástrica de los ratones de control (sin infección por *H. pylori*). Los resultados se muestran en la figura 12: resultados experimentales en un estudio del mecanismo inmunológico de los anticuerpos anti-HpHSP60. Esta figura muestra que el anticuerpo LHP-1 (9E4) inhibe el crecimiento de *H. pylori* o incluso elimina *H. pylori* inhibiendo la actividad de HpHSP60.

El anticuerpo LHP-1 (9E4) se generó utilizando la secuencia de aminoácidos de las posiciones 101 a 200 de HpHSP60 como antígeno. Los hibridomas que incluyen este anticuerpo, LHP-1 (9E4), se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, Estados Unidos, Designación ATCC: PTA-122900.

Forma de realización 12: Evaluación de la expresión de células Treg en mucosa gástrica

Para comprender los efectos del anticuerpo anti-HpHSP60 sobre la expresión de células Treg en la mucosa gástrica, los estómagos de ratón obtenidos en la forma de realización 10 se fijaron con formalina tamponada neutra al 10% y se embebieron en parafina. Se tiñeron secciones de cinco micrómetros con tinción H&E, seguida de tinción inmunohistoquímica de FoxP3. Los resultados se muestran en la figura 13. La figura 13 muestra resultados experimentales sobre efectos de los anticuerpos anti-HpHSP60 en expresiones de células Treg en la mucosa gástrica de ratones. En esta figura, todas las imágenes son representativas de los ratones sacrificados en la 8ª semana (aumento original de 200 μ m x 100). Los resultados muestran que no se observan expresiones de Treg en la mucosa gástrica de ratones que se trató con anticuerpos LHP-1 (9E4).

Forma de realización 13: Efectos de HpHSP60 sobre la expresión de IL-10 en la mucosa gástrica de ratones

Los estómagos de ratones obtenidos en la forma de realización 10 se fijaron con formalina tamponada neutra al 10% y se embebieron en parafina. Se tiñeron secciones de cinco micrómetros con tinción H&E, seguida de tinción inmunohistoquímica de IL-10. Los resultados se muestran en la figura 14. La figura 14 muestra resultados

experimentales sobre efectos de los anticuerpos anti-HpHSP60 en las expresiones de IL-10 en la mucosa gástrica de ratones. En esta figura, todas las imágenes son representativas de los ratones sacrificados en la 8ª semana (aumento original de 200 µm x 100; aumento original de 100 µm x 200). Los resultados muestran que no se observan expresiones de IL-10 en la mucosa gástrica de ratones que se trató con anticuerpos LHP-1 (9E4).

5 Forma de realización 14: Fragmentos de HpHSP60 identificables por el anticuerpo LHP-1 (9E4)

10 El anticuerpo LHP-1 (9E4) se utiliza para identificar diferentes longitudes de fragmentos de HpHSP60, para determinar fragmentos de HpHSP60 que pueden ser reconocidos por el anticuerpo LHP-1 (9E4). Los resultados se muestran en la figura 15. La figura 15 muestra resultados experimentales del reconocimiento de fragmentos HpHSP60 por el anticuerpo LHP-1 (9E4). En esta figura, las manchas oscuras representan identificaciones positivas. Los fragmentos que se identifican incluyen los siguientes, mientras que IgK se utiliza como controles positivos, dado que la mayor parte de los mAb de ratones son del tipo kappa:

15 Completo: la longitud total de HpHSP60, es decir, las posiciones 1-547.

1-200 - fragmento que incluye las posiciones 1-200 de HpHSP60.

20 101-200 - fragmento que incluye las posiciones 101-200 de HpHSP60.

1-250 - fragmento que incluye las posiciones 1-250 de HpHSP60.

200-300 - fragmento que incluye las posiciones 200-300 de HpHSP60.

25 300-547 - fragmento que incluye las posiciones 300-547 de HpHSP60.

Los resultados muestran que el fragmento HpHSP60 identificable por el anticuerpo LHP-1 (9E4) es la secuencia de las posiciones 101-200, cuya secuencia de aminoácidos es:

EGLRNITAGANPIEVKRGMDKAAEAIINELKKASKKVGKKEEITQVATISA

NSDHNIGKLIADAMEKVGKDGVTVEEAKGIEDELDDVVEGMQFDRGYLS

30 Forma de realización 15: Limitación adicional del fragmento HpHSP60 identificable por el anticuerpo LHP-1 (9E4)

35 Siguiendo el procedimiento de la forma de realización 14, se utiliza el anticuerpo LHP-1 (9E4) para identificar diferentes fragmentos con longitudes más cortas. Los resultados se muestran en la figura 16. La figura 16 muestra resultados de experimentos adicionales sobre el reconocimiento de fragmentos HpHSP60 por el anticuerpo LHP-1 (9E4). En esta figura, las manchas oscuras representan identificaciones positivas. Δ[1] representa las posiciones 134-200 de HpHSP60, con resultados positivos, mientras que Δ[5] representa las posiciones 101-168 de HpHSP60, con resultados negativos. Por lo tanto, se puede concluir que el fragmento HpHSP60 identificable por el anticuerpo LHP-1 (9E4) incluye las posiciones de aminoácidos 169-200 de HpHSP60, que son:

40 KDGVTVEEAKGIEDELDDVVEGMQFDRGYLS

45 Listado de secuencias

<110> Sagabio Co., Ltd.

<120> Anticuerpo monoclonal que inhibe las funciones inmunosupresoras de patógenos, fragmento de unión a antígeno del mismo e hibridomas que producen dicho anticuerpo.

50 <130> SB3302P-EP

<160> 13

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

55 <213> ratones

<400> 1

Met Glu Lys Val Gly Lys Asp Gly Val Ile Thr Val Glu
1 5 10

<210> 2

60 <211> 13

<212> PRT

<213> ratones

ES 2 773 485 T3

<400> 2
Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Val Phe Leu
1 5 10

5 <210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> ratones
<400> 3
Tyr Ala Ala Ser Asn
1 5

10 <210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> ratones
<400> 4
Gln Ser Asn Glu Val Phe Trp Thr
1 5

15 <210> 5
<211> 111
<212> PRT
<213> ratones
<400> 5
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 20 25 30
Gly Asp Val Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95
Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

25 <210> 6
<211> 131
<212> PRT
<213> ratones
<400> 6
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Val Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110
Gln Gln Ser Asn Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125
Glu Ile Lys
130

30 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
35 <213> ratones
<400> 7

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
 1 5
 <210> 8
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> ratones
 <400> 8
 Ile Ser Asn Gly Gly Ser
 1 5
 10 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> ratones
 <400> 9
 15 Gln Gly Leu Arg Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 20 <213> ratones
 <400> 10
 Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gln Gly Leu Arg Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25 <210> 11
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> ratones
 30 <400> 11

ES 2 773 485 T3

```

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1      5      10      15
Val Gln Cys Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20      25      30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35      40      45
Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50      55      60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
 65      70      75      80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85      90      95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100     105
Tyr Tyr Cys Thr Arg Gln Gly Leu Arg Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr
 115     120     125
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro
 130     135     140
Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser
 145     150     155     160
Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165     170     175
Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe
 180     185     190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr
 195     200     205
Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala
 210     215     220
His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp
 225     230     235     240
Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val
 245     250     255
Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr
 260     265     270
Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu
 275     280     285
Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln
 290     295     300
Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser
 305     310     315     320
Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys
 325     330     335
Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340     345     350
Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro
 355     360     365
Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met
 370     375     380
Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn
 385     390     395     400
Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr
 405     410     415
Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn
 420     425     430
Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu

          435          440          445
His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450          455          460

```

- 5 <210> 12
- <211> 100
- <212> PRT
- <213> Helicobacter pylori
- <400> 12

ES 2 773 485 T3

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

<210> 13

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Helicobacter pylori

<400> 13

Lys Asp Gly Val Ile Thr Val Glu Glu Ala Lys Gly Ile Glu Asp Glu
 1 5 10 15
 Leu Asp Val Val Glu Gly Met Gln Phe Asp Arg Gly Tyr Leu Ser
 20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1;
- 5 que comprende, además:
- en una región variable de una cadena ligera, una secuencia de aminoácidos representada por las posiciones 21-131 de la SEQ ID NO: 6; y
- 10 en una región variable de una cadena pesada, una secuencia de aminoácidos representada por las posiciones 20-141 de la SEQ ID NO: 11.
2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, que comprende en una región variable de una cadena ligera: una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4.
- 15
3. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que comprende en una región variable de una cadena pesada: una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7, una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9.
- 20
4. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, anticuerpo que está producido por un hibridoma con el número de depósito de designación ATCC: PTA-122900.
- 25
5. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, anticuerpo que comprende un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo constituido por Fab, Fab', (Fab')₂, Fv y scFv.
- 30
6. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, que comprende un isotipo de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG4, IgA, IgE e IgD.
7. Un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 35
8. Un hibridoma que tiene el número de depósito de designación ATCC: PTA-122900.
9. El anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de infecciones por H. pylori, anticuerpo que inhibe funcionalmente las funciones inmunosupresoras de H. pylori.
- 40
10. Una composición farmacéutica que comprende una dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o un fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 7.

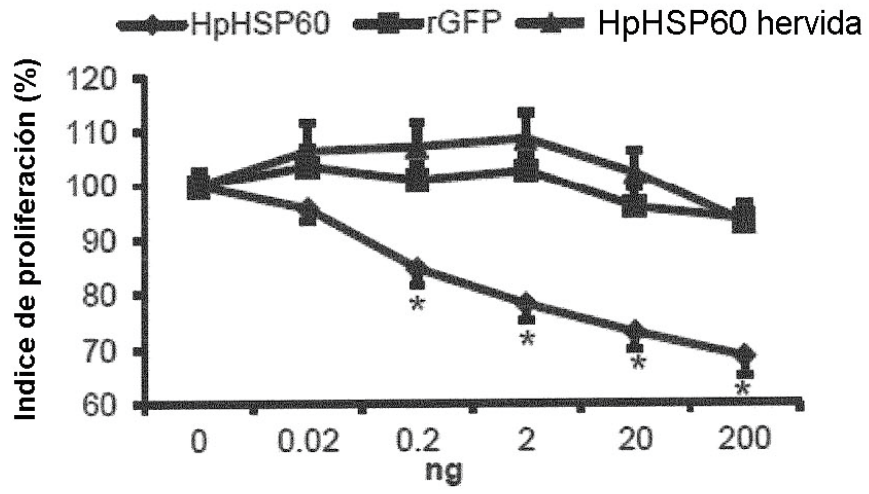


Fig. 1

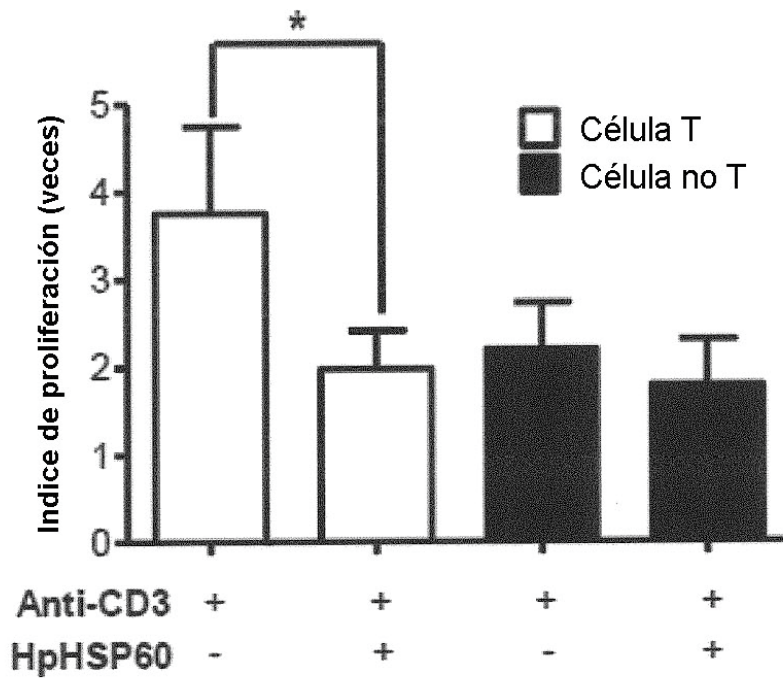


Fig. 2

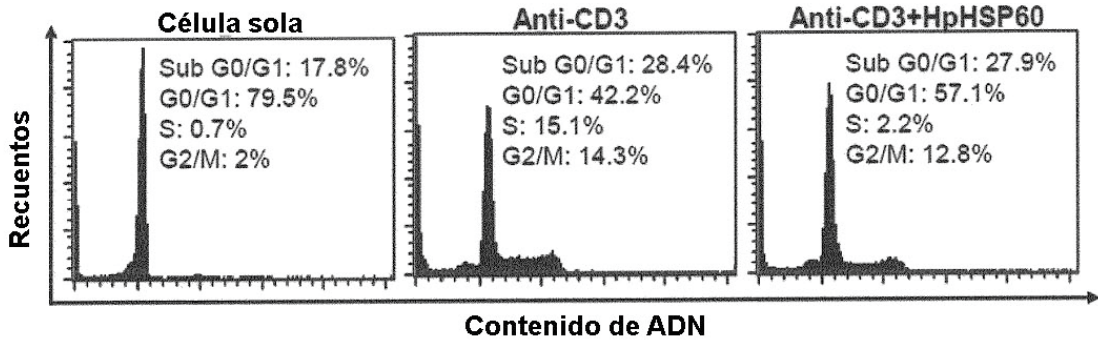


Fig. 3A

Fig. 3B

Fig. 3C

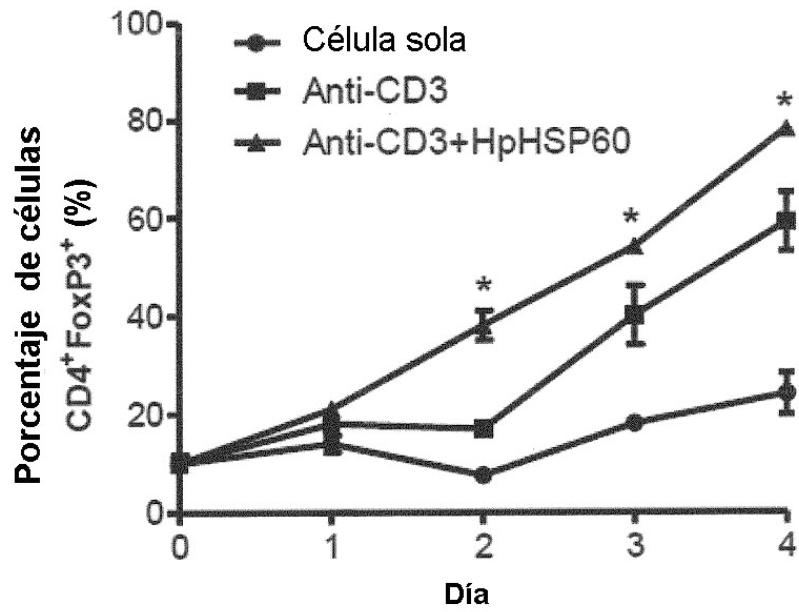


Fig. 4

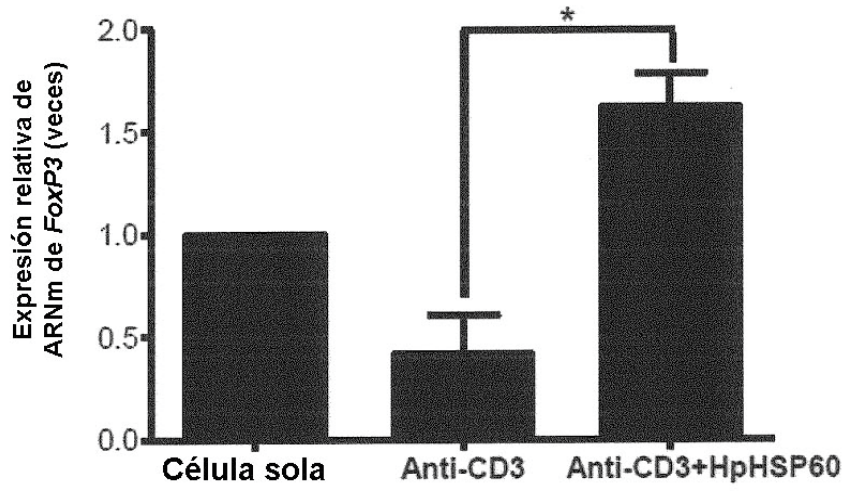


Fig. 5

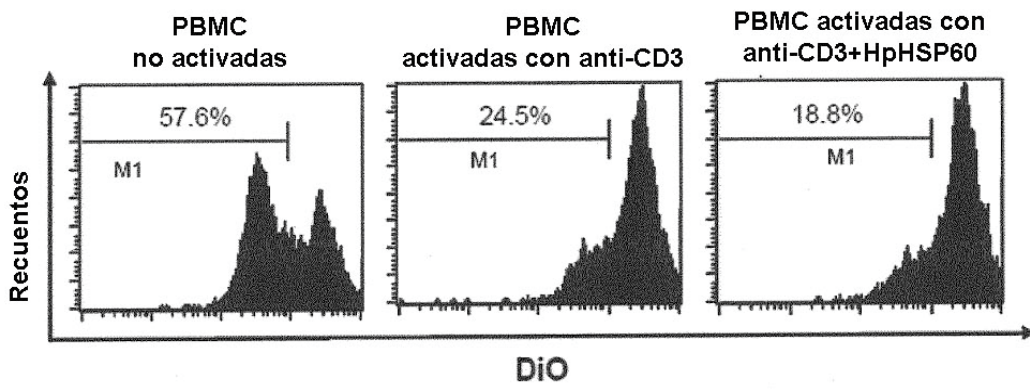


Fig. 6

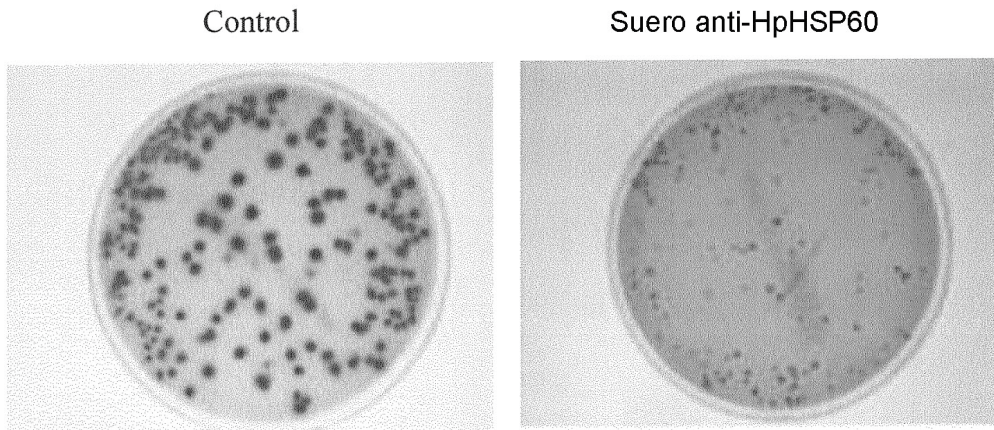


Fig. 7

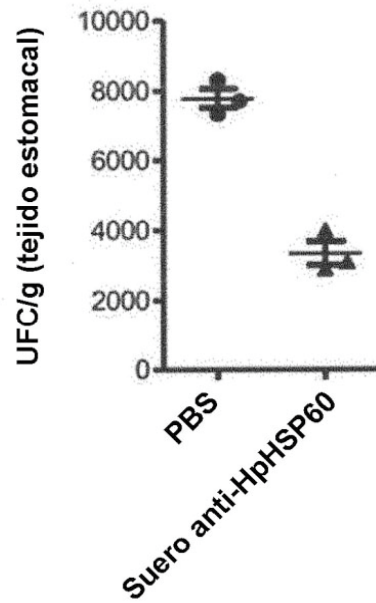


Fig. 8

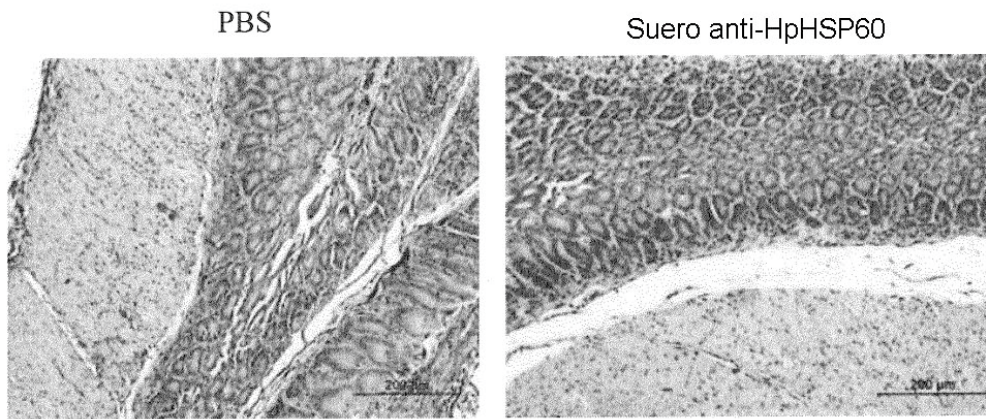


Fig. 9

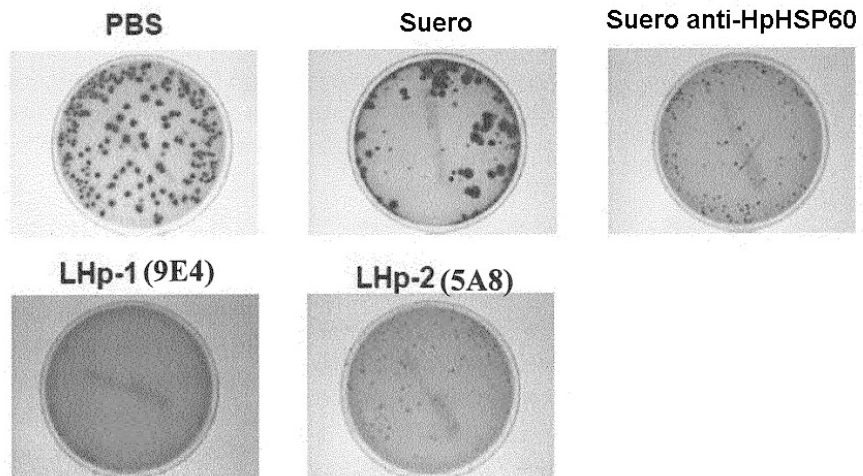


Fig.10

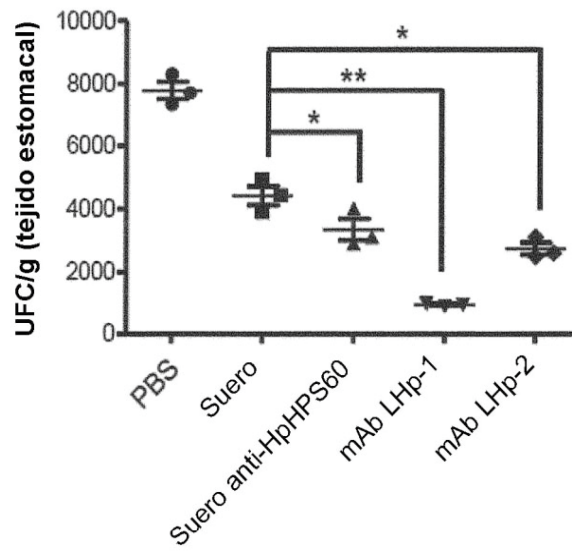


Fig. 11

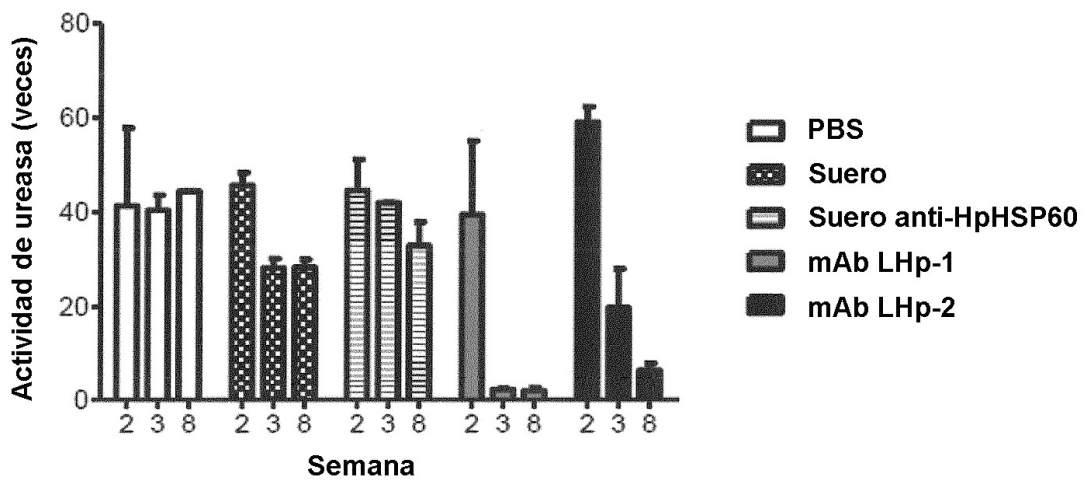


Fig. 12

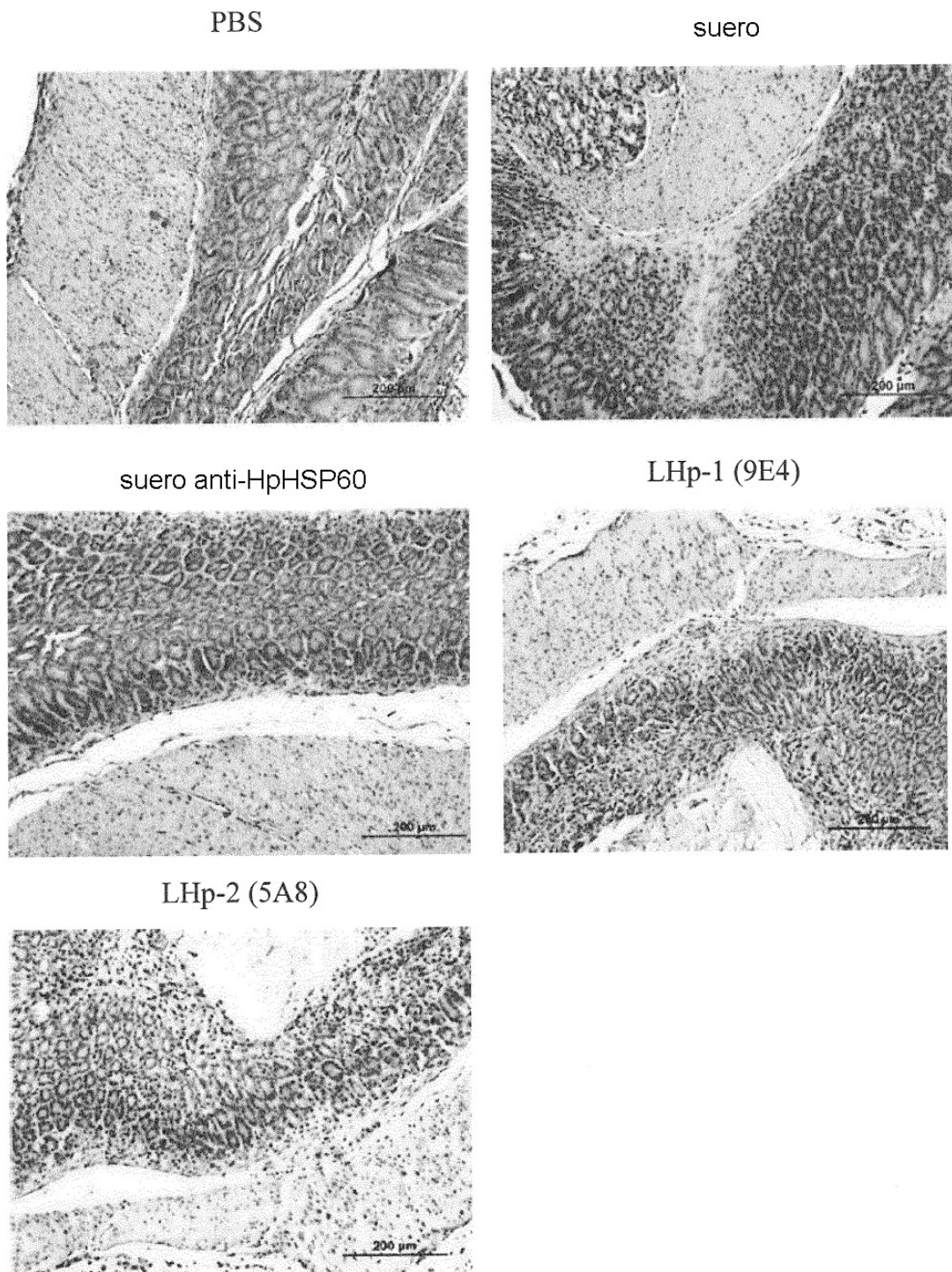


Fig. 13

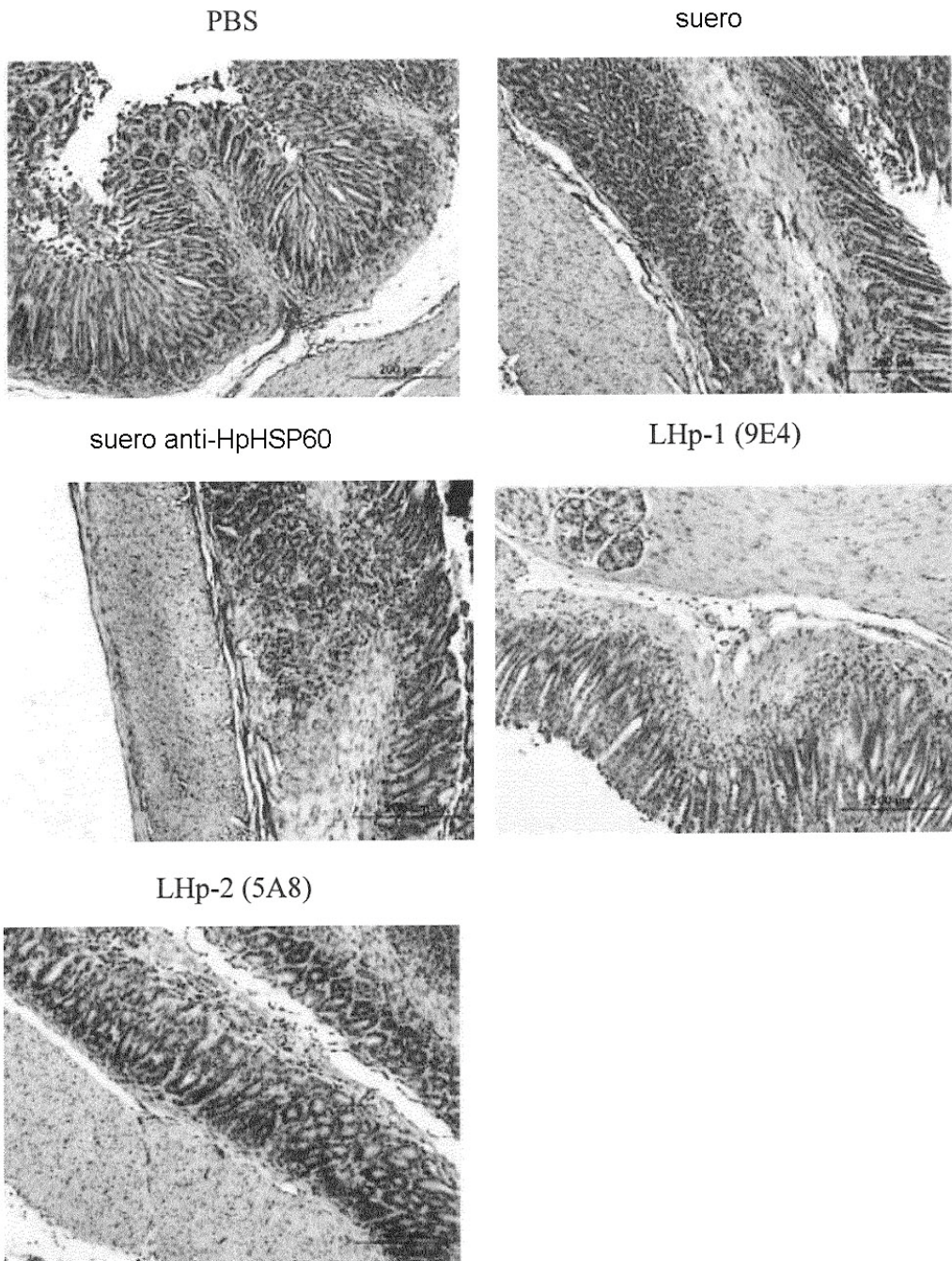


Fig. 14

LHp-1 (9E4)

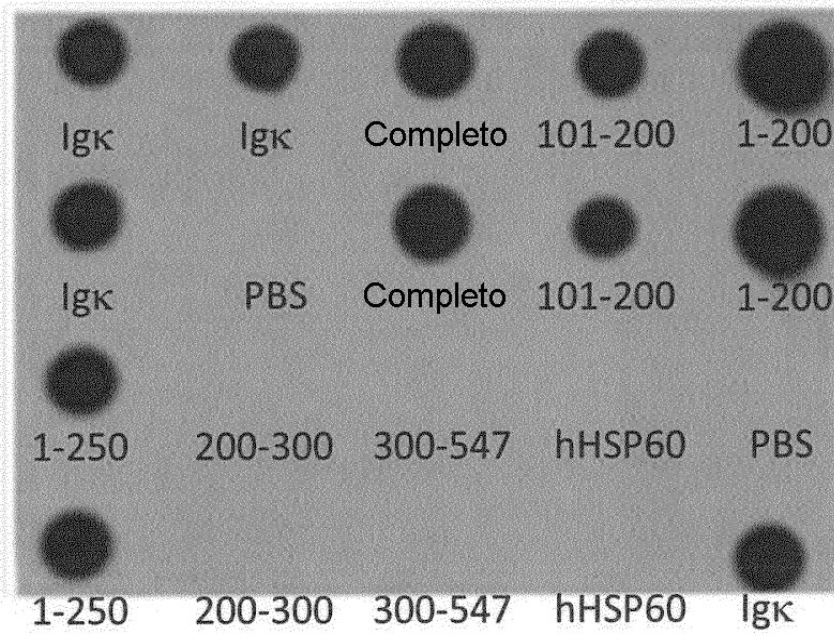


Fig. 15

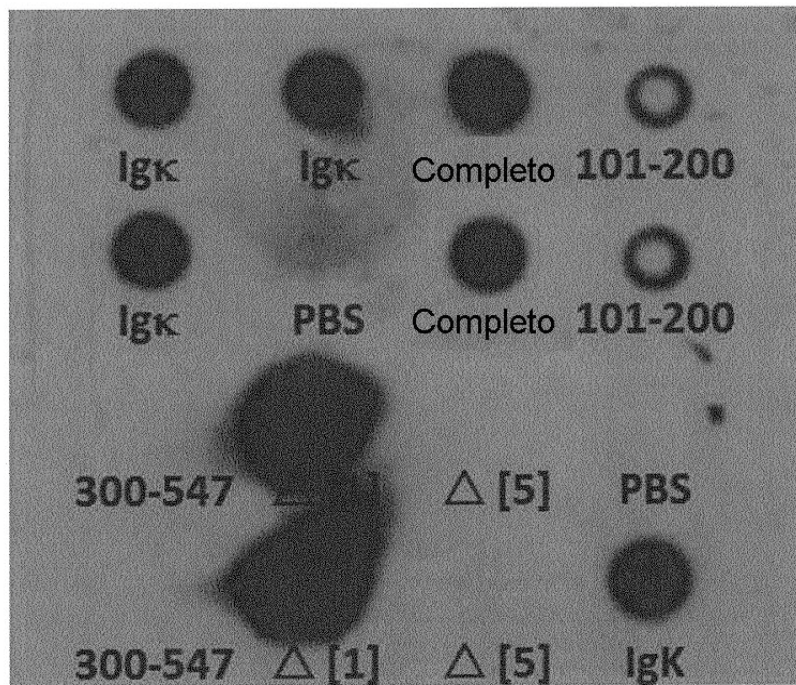


Fig. 16