

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 654**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2011 E 15182048 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2993183**

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

30 Prioridad:

16.02.2010 EP 10001569

30.09.2010 EP 10011978

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

11.08.2020

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

KERSTIN, DREIER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 778 654 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 VPH

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-E7 del VPH (virus del papiloma humano) capaces de reconocer específicamente un epítipo de la región C-terminal de una proteína E7 del VPH 16, a composiciones y kits de diagnóstico que comprenden dichos anticuerpos, así como a métodos para el diagnóstico inmunohistoquímico y basado en ELISA de infecciones por VPH que utilizan dichos anticuerpos.
- 10 Las infecciones de transmisión sexual con virus del papiloma humano (VPH) son el principal factor etiológico para el cáncer de cuello uterino. Se han descrito más de cuarenta, en particular más de treinta y cinco genotipos de VPH que pueden infectar células escamosas y glandulares epiteliales en la mucosa del cuello uterino. Basándose en datos epidemiológicos y bioquímicos, los VPH de ADN bicatenario se dividen en VPH de alto riesgo asociados con lesiones intraepiteliales escamosas con un alto potencial de progresión a carcinoma invasivo de células escamosas y VPH de bajo riesgo asociados con hiperplasia benigna. Se han detectado infecciones por genotipos de alto riesgo
- 15 en casi todas las lesiones neoplásicas del cuello uterino y al menos 15 tipos de VPH de alto riesgo se han asociado con el cáncer de cuello uterino. El VPH 16 es el genotipo más prevalente a nivel mundial con una incidencia en el carcinoma de células escamosas de aproximadamente el 55 %, seguido por el VPH 18 (aproximadamente el 17 %) y el VPH 45 (4-9 %).
- 20 La persistencia del VPH oncogénico es necesaria para el desarrollo del precáncer y cáncer de cuello uterino. Sin embargo, los factores que determinan la persistencia vírica y la progresión tumorigénica no se comprenden completamente. Los eventos iniciales de carcinogénesis de cuello uterino después de una infección vírica dependen del hecho de que los tipos de VPH de alto riesgo experimentan cambios específicos que anulan el control transcripcional de la expresión del gen vírico en los queratinocitos infectados. La inactivación de estas funciones de control celular permite la 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 apoyar la integración de los genomas episomales del VPH en los cromosomas de la célula hospedadora y contribuir a una mayor sobreexpresión de los genes víricos E6 y E7, lo que da como resultado un aumento de los niveles de oncoproteína E7 durante las primeras etapas de la carcinogénesis de cuello uterino.
- 25 El hecho de que las oncoproteínas víricas E6 y E7 son cruciales durante la carcinogénesis se demostró aún más 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, se requiere la sobreexpresión consistente de los oncogenes E6 y E7 para inducir y mantener el fenotipo transformado de las células de cáncer de cuello uterino.
- 30 Por lo tanto, la sobreexpresión de oncoproteínas E7 de tipos carcinogénicos de VPH es un rasgo característico del cáncer de cuello uterino. Esta conclusión está respaldada por un estudio reciente en el que se usaron anticuerpos purificados por afinidad contra las proteínas E7 del VPH de alto riesgo para detectar las oncoproteínas E7 del VPH 16, 18 y 45 en biopsias de pacientes con carcinoma invasivo de células escamosas de cuello uterino (Ressler et al., 2007, Clin Cancer Res, 13:7067-7072), lo que indica que las oncoproteínas E7 de alto riesgo de estos tipos principales de VPH de alto riesgo se expresan continuamente en el carcinoma de cuello uterino invasivo.
- 35 Actualmente, la detección clínica del cáncer de cuello uterino se basa principalmente en la evaluación citológica de las células contenidas en los frotis de cuello uterino, conocido como citología exfoliativa (o prueba de Papanicolaou; Papanicolaou, 1942, Science, 95:438-439), que se hacen habitualmente en mujeres que participan en programas de detección. El resultado del análisis citológico depende de la detección de células anómalas por parte de patólogos experimentados. Aunque la implementación de este ensayo simple y eficaz ha ayudado a reducir considerablemente la mortalidad por cáncer de cuello uterino, el diagnóstico de la prueba de Papanicolaou todavía se caracteriza por una alta tasa de resultados con falsos positivos y falsos negativos (Foucar, 2005, Semin Diagn Pathol, 22(2):147-155).
- 40 En un enfoque alternativo, la detección de ADN de VPH de alto riesgo se ha introducido en la práctica clínica. En esta configuración, se aplica un ensayo de detección de ADN sensible (por ejemplo, captura de híbrido 2TM; Digene Inc., EE.UU.) para determinar la presencia de ADN del VPH de alto riesgo en muestras de pacientes. Aunque este ensayo es muy adecuado para detectar infecciones por virus del papiloma del tipo de alto riesgo, no puede discriminar entre infecciones transitorias, que regresan espontáneamente en la mayoría de los casos, y la aparición de cáncer de cuello uterino. Más recientemente, se han desarrollado sistemas de diagnóstico que detectan la presencia de ARNm de E6/E7 en frotis de cuello uterino, como marcador sustituto para 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 de ARN puede no ser la mejor herramienta para la detección del cáncer de cuello uterino (Hafner et al., 2008, Oncogene, 27(11):1610-1617). De acuerdo con esta noción, la infección por VPH subyacente no se pudo detectar mediante análisis de PCR en
- 45 todos los tumores examinados por Ressler et al., 2007.
- 50
- 55
- 60
- 65

Por lo tanto, la detección de la proteína E7 parece ser la herramienta de diagnóstico superior. Ya se conocen diversos anticuerpos en la técnica, pero muestran baja sensibilidad o especificidad o se describe que reaccionan de forma cruzada con las proteínas E7 de varios tipos de VPH. También, como los anticuerpos policlonales solo pueden ser producidos en una cantidad limitada por un animal, hay diferencias entre lotes. La dificultad para producir anticuerpos monoclonales altamente específicos y sensibles contra las proteínas E7 se debe principalmente a la baja inmunogenicidad de las proteínas E7.

El documento WO 07/059492 por ejemplo, desvela métodos, ensayos y kits para la detección de ADN o proteínas del VPH, empleando entre otros anticuerpos monoclonales y policlonales contra la proteína E7 del HPV 16, capaz de detectar de manera fiable la cantidad bastante alta de alrededor de 1 µg de proteína recombinante E7 del HPV 16.

El documento WO 05/026731 desvela una combinación de anticuerpos que comprende (a) anticuerpo anti-E7 del HPV-16 que se puede obtener (i) desencadenando una respuesta humoral *in vivo* contra la proteína E7 del HPV-16 o un fragmento de la misma en una cabra y (ii) anticuerpos purificadores de afinidad como se obtiene en la etapa de activación (i) y (b) un anticuerpo anti-E7 del HPV-18. El anticuerpo anti-E7 del VPH-16 descrito reacciona de forma cruzada con proteínas E7 de otros tipos de VPH de alto riesgo.

El documento WO 06/085822 se refiere a la presentación en fago de segmentos definidos de oncoproteínas E7 del HPV 16 y 18, excluyendo motivos conservados evolutivamente, así como regiones con alta similitud con proteínas E7 de HPV de bajo riesgo para su uso como inmunógenos para establecer anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón.

El documento FR 2 794371 describe fragmentos de péptidos poliepitópicos de E6 y E7 del HPV 16 que se unen a moléculas de HLA y las aplicaciones médicas de los mismos, incluyendo la generación de mAAb y el uso en diagnóstico.

Por consiguiente, el problema técnico que subyace a la presente invención es superar las dificultades mencionadas anteriormente y proporcionar medios altamente específicos y más sensibles para un diagnóstico rentable, rápido y fiable de infecciones por VPH de alto riesgo.

La presente invención resuelve su problema subyacente de acuerdo con la enseñanza del independiente. Por consiguiente, la presente invención proporciona una línea celular de hibridoma, que tiene el n.º de registro DSM ACC3034 y un anticuerpo monoclonal, que se puede obtener del sobrenadante de la línea celular de hibridoma, que es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región C-terminal de la proteína E7 del HPV 16. La presente solicitud muestra que el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3, 6 o 7.

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

Se entiende que el término "especificidad" o "reconocimiento/unión específica" se refiere a la propiedad de un anticuerpo para reconocer o unirse específicamente a preferentemente solo un epítipo específico y preferentemente no muestra o sustancialmente no tiene reactividad cruzada con otro epítipo. Preferentemente, "especificidad" o "reconocimiento/unión específica" significa que el anticuerpo reconoce o se une específicamente a preferentemente solo un epítipo específico y preferentemente no muestra o sustancialmente no tiene reactividad cruzada con otro epítipo, en donde dicho epítipo es único para una proteína, de modo que el anticuerpo no muestra o no tiene reactividad cruzada con otro epítipo y otra proteína.

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

En general, el término "epítipo" se refiere a una región antigénica de una proteína dada que consta de 4 a 50, preferentemente de 5 a 15, preferentemente de 8 a 11 aminoácidos, o más. Esta región o epítipo antigénico se reconoce específicamente por el sitio o sitios de unión al antígeno del anticuerpo.

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

En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal anti-E7 del VPH reconoce específicamente un epítipo del dominio del dedo de zinc de la región C-terminal de la proteína E7 del VPH, preferentemente dicho epítipo es un epítipo conformacional.

Los anticuerpos monoclonales según la presente invención se usan preferentemente para detectar proteínas E7 del VPH naturales, es decir, no desnaturalizadas.

En el contexto de la presente invención, la expresión "epítipo conformacional" se refiere a un epítipo tridimensional al cual el anticuerpo reconoce o se une específicamente, al contrario de 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, por la estructura terciaria. Por lo tanto, los aminoácidos de un epítipo conformacional que define la antigenicidad de una proteína no necesariamente tienen que ser aminoácidos consecutivos de la proteína, sino que pueden estar distantes entre sí en la secuencia proteica primaria para formar el epítipo conformacional, solo si la proteína está plegada en su estructura terciaria. En su mayoría, tales 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 VPH contienen un dominio de dedo de zinc en su parte C-terminal, que forma una estructura rígida altamente ordenada, principalmente debido a 4 restos de cisteína. Estos restos de cisteína coordinan el zinc y, por lo tanto, representan un epítipo conformacional. Sorprendentemente, se ha descubierto que los anticuerpos monoclonales según la presente invención que son capaces de reconocer o unirse a dicho epítipo conformacional, son capaces de detectar una proteína E7 del VPH de una manera altamente específica y altamente sensible.

La presente descripción desvela un anticuerpo monoclonal que es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región C-terminal, preferentemente el dominio del dedo de zinc, de la proteína E7 de los subtipos de VPH 16, en particular los tipos de VPH 16, 31, 33, 35, 52, 58 o de los subtipos de VPH 18, en particular, los tipos de VPH 18, 39, 45, 59, 68, 70 o de ambos subtipos de VPH 16 y 18. Preferentemente, el epítipo reconocido es un epítipo conformacional. El epítipo reconocido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 (no según la presente invención) que es un motivo de secuencia de epítipo común presente en los epítipos descritos en el presente documento. El motivo del epítipo caracterizado por la SEQ ID NO: 1 (no según la presente invención) representa un motivo de epítipo consensuado para los subtipos de VPH 16 y 18 y es: Val Cys Pro Xaa Cys, con Xaa siendo cualquier aminoácido.

La expresión "motivo de epítipo de consenso" tal como se emplea en el presente documento se refiere a partes específicas de un epítipo que son compartidas por las proteínas E7 de los subtipos de VPH 16 y/o 18. A pesar de compartir un motivo de epítipo de consenso, las regiones C-terminales de los subtipos de VPH 16 y/o 18, en particular, los epítipos específicos contenidos en ellos y que contienen este motivo de epítipo son, debido a secuencias de aminoácidos específicas y/o a una conformación específica de la secuencia de aminoácidos, sustancialmente lo suficiente diferentes, para que los anticuerpos específicos puedan reconocer específicamente una proteína E7 particular de un tipo específico de VPH, es decir, son capaces de identificar específicamente un tipo particular de VPH.

El anticuerpo monoclonal desvelado es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región C-terminal, preferentemente el dominio del dedo de zinc, de los subtipos de VPH 16, en particular 16, 31, 33, 35, 52 y 58. Preferentemente, el epítipo reconocido es un epítipo conformacional. El epítipo reconocido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2 (no según la presente invención) que es un motivo de secuencia común presente en los epítipos de los subtipos del VPH 16. El motivo del epítipo caracterizado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 representa un motivo de epítipo de consenso específico para los subtipos del VPH 16, y es: Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Val Cys Pro Xaa Cys, con Xaa siendo cualquier aminoácido.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo monoclonal es capaz de reconocer específicamente la proteína E7 del VPH 16. El epítipo reconocido comprende, preferentemente consiste en, la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3. El epítipo caracterizado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 representa un epítipo conformacional específico del dominio del dedo de zinc en la parte C-terminal de la proteína E7 del VPH 16, y es: Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys. Estos aminoácidos representan las posiciones 85 a 97 de la proteína E7 del VPH 16. Una realización adicional del epítipo conformacional está representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y es: Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro. Estos aminoácidos representan las posiciones 86 a 98 de la proteína E7 del VPH 16. La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 representa una realización del epítipo conformacional de la SEQ ID NO: 3 y 7 y es: Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys. Estos aminoácidos representan las posiciones 86 a 97 de la proteína E7 del VPH 16. Todas estas secuencias de epítipos comprenden dos de los cuatro restos de cisteína que coordinan el ion zinc del dominio del dedo de zinc en dos motivos CXXC. El mapeo de epítipos usando micromatrices con péptidos 13-meros sintéticos derivados de la E7 del VPH 16 identificó este epítipo para que el anticuerpo monoclonal de la presente invención lo reconozca muy específicamente (véase la figura 10). Una alineación de las secuencias de la proteína E7 del VPH sugirió que especialmente los aminoácidos aguas arriba y aguas abajo del motivo altamente conservado 90VCPXC94 dentro del epítipo de la SEQ ID NO: 3, 6 y 7 proporcionan el reconocimiento específico de la proteína E7 del VPH 16 por el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

Un análisis mutacional demostró que los péptidos que contienen una mutación puntual en el sitio de coordinación de

- zinc no podían ser detectados por el anticuerpo monoclonal contra la proteína E7 del VPH 16, mientras que la eliminación de mutantes de otras regiones se pudo detectar fácilmente. Esto indica claramente que un dominio de dedo de zinc intacto, representando un epítipo conformacional, es necesario para el reconocimiento específico de la proteína E7 del VPH 16 por el anticuerpo monoclonal según la presente invención. Esto se ilustra mejor por la
- 5 incapacidad del anticuerpo monoclonal contra E7 del VPH 16 de la presente invención para reconocer el mutante C58G de la E7 del VPH 16, en donde el resto de cisteína en la posición 58 se cambia a glicina, que contiene la secuencia requerida para reconocer el epítipo lineal, pero ha perdido la capacidad de proporcionar este epítipo en un dominio de dedos de zinc conformacional.
- 10 De acuerdo con la naturaleza conformacional del epítipo de las SEQ ID NO: 3 y 7, en particular, la SEQ ID NO: 6, el anticuerpo monoclonal que reconoce este epítipo tiene que usarse en concentraciones mucho más altas (por ejemplo, 15 µg/ml para detectar 10 ng de proteína purificada) en aplicaciones como el análisis por transferencia de Western o el reconocimiento de proteínas en lisados celulares, en donde las proteínas están desnaturalizadas, que los anticuerpos policlonales conocidos contra la E7 del VPH 16.
- 15 Este epítipo, preferentemente el epítipo conformacional de C-terminal, se encuentra dentro de una región de la proteína E7 que generalmente presenta baja inmunogenicidad. Sorprendentemente, se podría demostrar que el anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo tal como se proporciona en las SEQ ID NO: 3 y 7, en particular, la SEQ ID NO: 6, es capaz de detectar específicamente la proteína E7 del VPH 16 de una manera altamente sensible y
- 20 no reacciona de forma cruzada con las proteínas E7 de otros tipos de VPH, preferentemente en aplicaciones no desnaturalizantes. En particular, el anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16 no reaccionó de forma cruzada con las proteínas E7 del VPH 18 o del VPH 45, cuando estas proteínas se sobreexpresaron en células U-2OS. También, el anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16 detectó fuertemente la proteína E7 endógena de células
- 25 CaSki positivas para VPH 16 en experimentos de inmunofluorescencia. Por el contrario, no se observó señal en células U-2OS no transfectadas o en células HeLa positivas para el VPH 18. Para caracterizar con mayor precisión la reacción cruzada del anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16, se empleó un ensayo ELISA usando proteínas E7 de diferentes tipos de VPH. También, no se encontró reactividad cruzada contra las proteínas E7 de otros tipos de VPH, como otros genotipos de VPH de alto riesgo y los dos tipos de VPH de bajo riesgo más comunes, VPH 6 y VPH 11.
- 30 Además, la preincubación del anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16 con la proteína E7 del VPH 16 purificada evitó la detección de la E7 del VPH 16 asociada a células, dado que el anticuerpo ya estaba específicamente unido a la proteína E7 del VPH 16 preincubada.
- 35 En comparación con la técnica anterior, el presente anticuerpo monoclonal es al menos 20 veces, en particular al menos 100 veces, más sensible sin pérdida de especificidad. Como las infecciones con VPH 16 representan más del 50 % de los casos de carcinoma de cuello uterino en todo el mundo, el anticuerpo altamente específico de acuerdo con la presente invención es adecuado para servir como una herramienta de diagnóstico altamente eficaz y fiable. Ventajosamente, se podría demostrar que el anticuerpo monoclonal anti-E7 del VPH 16 de acuerdo con la presente
- 40 invención puede detectar cantidades bajas tales como 1 pg, en particular 500 fg, de la proteína E7 del VPH 16 en un ensayo basado en ELISA (ensayo de inmunosorción enzimática), mientras que los anticuerpos desvelados en el documento WO 07/059492 solo podían detectar concentraciones de proteína E7 del VPH 16 de aproximadamente 1 µg. El anticuerpo monoclonal anti-E7 del VPH 16 según la presente invención, por lo tanto, puede usarse en concentraciones mucho más bajas, por ejemplo 10 pg/µl, lo que hace que su aplicación como herramienta de
- 45 diagnóstico también sea más rentable.
- Usando el presente anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16 también se podría demostrar que la localización subcelular de la proteína E7 del VPH 16 varía durante el ciclo celular entre predominantemente citoplasmática y
- 50 predominantemente nuclear.
- Se ha demostrado que los niveles de proteína E7 aumentan de niveles indetectables a niveles sustanciales durante la carcinogénesis. Con los anticuerpos monoclonales altamente sensibles de acuerdo con la invención es posible detectar no solo células tumorales de carcinoma de células escamosas y adenocarcinomas, sino también células de neoplasia intraepitelial de cuello uterino precancerosa de alto grado y carcinoma in situ (CIN III y CIS), así como
- 55 neoplasia intraepitelial de cuello uterino glandular de grado III y adenocarcinoma in situ (CIGN III y AIS), que se han documentado que tienen un alto potencial para progresar a cáncer invasivo. Esto podría permitir ventajosamente el diagnóstico temprano de CIN III precanceroso de alto grado, CIS, CIGN III, ACIS y AIS antes de su progresión a tumores malignos, ya que los anticuerpos monoclonales según la presente invención pueden discriminar entre lesiones precancerosas de bajo grado de células escamosas y de origen glandular (CIN I-II, CIGN I-II, por un lado, y
- 60 precánceres de alto grado (CIN III, CIS, CIGN III) y cánceres (CxCa, AdCa) de células escamosas y de origen glandular por otro lado. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención pueden servir como una nueva herramienta para identificar precánceres y cánceres de alto grado de células escamosas y de origen glandular.
- 65 La presente solicitud demuestra que el anticuerpo monoclonal de la invención que es específicamente capaz de reconocer la proteína E7 del VPH 16, reconoce específicamente un epítipo que comprende la SEQ ID NO: 3 y 7, en

particular, la SEQ ID NO: 6. y comprende, preferentemente consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de ADNc SEQ ID NO: 9 o una cadena ligera que tiene la secuencia de ADNc SEQ ID NO: 10 o ambas.

Se describe un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos codificada por al menos una de las SEQ ID NO: 9 o 10. También versiones mutadas de las SEQ ID NO: 9 o 10, es decir, secuencias que comprenden adiciones, deleciones y/o sustituciones de nucleótidos simples o múltiples en comparación con la SEQ ID NO: 9 o 10 siempre que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo codificado por la secuencia mutada aún pueda presentar la especificidad y la sensibilidad de la inmunoglobulina completa.

La presente invención también se refiere a una línea celular de hibridoma, preferiblemente de un mamífero, más preferentemente, una línea celular de hibridoma de conejo, capaz de producir el anticuerpo monoclonal identificado anteriormente de acuerdo con la invención, en particular del anticuerpo capaz de reconocer un epítipo de la región C-terminal del VPH 16, en particular un epítipo conformacional. En particular, la presente invención se refiere a la línea celular de hibridoma que tiene el n.º de registro DSM ACC 3034. La presente invención también se refiere al anticuerpo monoclonal, que se puede obtener del sobrenadante de una línea celular de hibridoma de acuerdo con la presente invención.

La expresión "línea celular de hibridoma" tal como se usa en el presente documento se refiere a una línea celular obtenida fusionando células de mieloma, preferentemente inmortalizadas, de mamífero, en particular, de conejo, células linfoides con linfocitos B del bazo de un mamífero, preferentemente, de un conejo que ha sido inmunizado con el antígeno deseado, es decir, una proteína E7 del VPH purificada. Tal línea celular de hibridoma inmortal es capaz de producir un tipo específico y definido de anticuerpo que se secreta en el medio de cultivo celular o sobrenadante. El término "monoclonal" se refiere a la línea celular de la que se obtiene el anticuerpo, en donde todas las células son clones de una sola célula parental. Esto permite ventajosamente procedimientos estandarizados de producción y purificación para obtener anticuerpos monoclonales de la misma calidad.

Asimismo, tales líneas celulares de hibridoma se pueden cultivar indefinidamente en los medios de cultivo celular adecuados, proporcionando así una fuente infinita del anticuerpo monoclonal, sin variaciones entre lotes. Esto es particularmente ventajoso para una aplicación de anticuerpos monoclonales en rutinas de diagnóstico clínico, ya que se pueden omitir las pruebas que requieren mucho tiempo de nuevos lotes de anticuerpos y los métodos de diagnóstico producen resultados constantes y fiables.

La presente descripción también desvela un anticuerpo monoclonal que es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región C-terminal, preferentemente el dominio del dedo de zinc, de los subtipos de VPH 18, en particular 18, 39, 45, 59, 68 y 70. Preferentemente, el epítipo reconocido es un epítipo conformacional. Preferentemente, 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 de VPH 18 y es: Phe Val Cys Pro Xaa Cys Ala Xaa Xaa Gin, con Xaa siendo cualquier aminoácido.

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

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

La expresión "región N-terminal" tal como se usa en el presente documento se refiere a los 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 aminoácidos N-terminales de la proteína E7 del VPH como máximo.

El anticuerpo monoclonal desvelado reconoce específicamente un epítipo de la región N-terminal de la proteína E7 de los subtipos del VPH 18, en particular los tipos de VPH 18, 39, 45, 59, 68, 70, preferentemente del VPH 18, del VPH 45 o ambos. Preferentemente, el anticuerpo desvelado que reconoce específicamente la región N-terminal de la proteína E7 del VPH 18 muestra reactividad cruzada con el VPH 11, 45, 56, 58, 59 y 70. En particular, el anticuerpo que reconoce específicamente la región N-terminal de la proteína E7 del VPH 18 muestra un alto nivel de reactividad cruzada con el VPH 18, 45 y 56, un nivel intermedio de reactividad cruzada con el VPH 6 y 39, y un bajo nivel de reactividad cruzada con VPH 11, 33, 52, 58 y 59 con las respectivas proteínas E7 sobreexpresadas transitoriamente por células U-2OS en un ensayo de inmunofluorescencia. En un ensayo basado en ELISA, sin embargo, se pudo demostrar que el anticuerpo monoclonal desvelado capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región N-terminal de la proteína E7 del VPH 18 solo reacciona de forma cruzada sustancialmente con la proteína E7 del VPH 45. También, el anticuerpo monoclonal desvelado capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región N-terminal fue capaz de detectar fuertemente la proteína E7 endógena de células HeLa positivas para el VPH 18, mientras que no se obtuvo ninguna señal en células U-2OS no transfectadas o en células CaSki positivas para el VPH 16, tanto en experimentos de inmunofluorescencia como en análisis por transferencia

de Western.

Preferentemente, el epítipo N-terminal específico reconocido comprende, preferentemente consiste en, la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5 (no según la presente invención) y es: Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu. Estos aminoácidos representan las posiciones 5 a 13 de la proteína E7 del VPH 18. Una realización adicional del epítipo de N-terminal desvelado está representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 (no según la presente invención) y es: Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu. Estos aminoácidos representan las posiciones 4 a 13 de la proteína E7 del VPH 18.

Ventajosamente, se podría demostrar que el anticuerpo monoclonal anti-E7 del VPH 18 desvelado es capaz de detectar cantidades bajas, como 1 pg, en particular 500 fg, de la proteína E7 del VPH 18 en un ensayo basado en ELISA.

La presente descripción también desvela una línea celular de hibridoma, preferentemente una línea celular de hibridoma de un mamífero, más preferentemente de un conejo, capaz de producir el anticuerpo monoclonal capaz de reconocer específicamente un epítipo de la región N-terminal de la proteína E7 del VPH 18, preferentemente capaz de reconocer un epítipo con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 u 8 (no de acuerdo con la presente invención). La línea celular de hibridoma tiene el número de registro DSM ACC 3035. La presente descripción también desvela el anticuerpo monoclonal, que se puede obtener del sobrenadante de una línea celular de hibridoma.

Los anticuerpos monoclonales según la presente invención preferentemente son anticuerpos monoclonales de mamíferos, preferentemente de conejo (RabMab), 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 obtener anticuerpos monoclonales de alta calidad.

Para diversas aplicaciones, los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención pueden marcarse de manera detectable con un agente radiactivo, grupo enzimático o fluorescente. Existen varias técnicas disponibles para marcar biomoléculas tales como anticuerpos, que son bien conocidos por el experto en la materia. Los marcadores de uso común comprenden, entre otros, fluorocromos, tales como fluoresceína, rodamina, Texas Red, Cy3 o Cy5, enzimas como la peroxidasa, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina o acetilcolinesterasa, isótopos radiactivos, digoxigenina, metales coloidales, compuestos químic o bioluminiscentes. Preferentemente, los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención están marcados con biotina. En otra realización preferida, los anticuerpos de la presente invención se detectan por métodos secundarios, como inmunofluorescencia indirecta. Por consiguiente, los anticuerpos secundarios marcados de forma detectable pueden emplearse para detectar de manera específica los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también se refiere a una composición de diagnóstico, que comprende los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención como un agente activo. Dicha composición de diagnóstico puede, en una realización preferida, comprender el anticuerpo monoclonal de la presente invención en forma soluble o en fase líquida. En otra realización preferida, los presentes anticuerpos están unidos, enlazados y/o anclados a un soporte sólido. En otra realización preferida, la presente composición de diagnóstico comprende los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención formulados con un vehículo diagnósticamente aceptable, diluyente, tampón o solución de almacenamiento. La composición de diagnóstico de la presente invención comprende en una realización preferida los anticuerpos monoclonales individualmente o en combinaciones de acuerdo con los requisitos de la aplicación prevista. Preferentemente, dicha composición de diagnóstico se utiliza para la detección inmunológica, preferentemente inmunohistológica, basada en inmunofluorescencia o ELISA de la proteína E7 del VPH en una muestra biológica para permitir el diagnóstico de infecciones por VPH.

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

El kit de diagnóstico de la presente invención comprende en una realización preferida los anticuerpos monoclonales individualmente o en combinaciones de acuerdo con los requisitos de la aplicación prevista.

El kit de diagnóstico según la presente invención se usa preferentemente para la detección inmunológica, preferentemente inmunohistoquímica, basada en inmunofluorescencia o ELISA de la proteína E7 del VPH, permitiendo de este modo el diagnóstico de infecciones por VPH. Preferentemente, el kit de diagnóstico de la presente invención comprende además opcionalmente uno o más tampones, soluciones de almacenamiento y/u otros reactivos o materiales necesarios para fines médicos, científicos o de diagnóstico. Asimismo, partes del kit de diagnóstico pueden empaquetarse individualmente en viales o botellas o en combinación en recipientes o unidades de múltiples recipientes.

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

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la detección de la proteína E7 del VPH 16, que comprende i) incubar una muestra biológica con el anticuerpo monoclonal según la presente invención y ii) medir y/o detectar la proteína E7 del VPH 16 en la muestra biológica midiendo y/o detectando el anticuerpo específicamente unido a la proteína E7.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* para el diagnóstico inmunológico, preferentemente inmunohistoquímico o basado en inmunofluorescencia, de infecciones por VPH 16, que comprende a) incubar una muestra biológica con los anticuerpos monoclonales según la presente invención y b) medir y/o detectar la proteína E7 del VPH 16 en la muestra biológica midiendo y/o detectando el anticuerpo unido específicamente a la proteína E7 y, por lo tanto, permitiendo el diagnóstico de una infección por VPH 16. Ventajosamente, la aplicación de los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención en dicho método de diagnóstico permite una detección altamente sensible y fiable de infecciones por VPH de alto riesgo, ya que los anticuerpos monoclonales según la presente invención presentan una proporción de señal/ruido muy alta con un fondo insignificante. El anticuerpo monoclonal contra el extremo C-terminal de la E7 del VPH 16 según la presente invención se usa en este método, ya que no muestra reactividad cruzada con otros tipos de VPH y una sensibilidad muy alta.

La expresión "muestra biológica" tal y como se emplea en este documento se entiende que se refiere a cualquier tipo de tejido biológico, células y/u órganos, preferentemente biopsias de cuello uterino o frotis, preferentemente la prueba de Papanicolaou.

La presente invención se refiere además a un método *in vitro* para el diagnóstico basado en ELISA de infecciones por VPH 16, que comprende aa) recubrir un soporte con anticuerpos de captura dirigidos contra proteínas E7 del VPH, bb) añadir una muestra biológica, preferentemente un lisado celular, al soporte recubierto, cc) incubar el soporte con el anticuerpo monoclonal de detección de acuerdo con la presente invención, y dd) identificar la proteína E7 del VPH 16 unida específicamente por los anticuerpos de captura midiendo y/o detectando el anticuerpo monoclonal de detección específicamente unido a la proteína E7 y, por lo tanto, permite el diagnóstico de una infección por VPH 16. Cuando se usa como anticuerpo de detección en este método, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención están preferentemente biotinilados, ya que esto lleva a un aumento en la especificidad y en la sensibilidad de la detección de la E7 del VPH.

Preferentemente, los anticuerpos policlonales de cabra se usan como anticuerpos de captura para el método de diagnóstico basado en ELISA, que son capaces de reconocer las proteínas E7 de los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 y 59. Como estos anticuerpos policlonales de cabra solo se unen a las proteínas E7 de los tipos de VPH de alto riesgo, la aplicación del anticuerpo anti-E7 del VPH 16 como anticuerpos de detección permite ventajosamente la detección de los tipos 16 del VPH de alto riesgo.

Como soporte o soporte sólido, se usan preferentemente placas de ELISA, pero el experto en la materia también puede elegir diferentes vehículos o materiales.

Los lisados celulares a ensayar con el método basado en ELISA se preparan preferentemente a partir de muestras biológicas, preferentemente biopsias de cuello uterino o frotis, preferentemente la prueba de Papanicolaou.

La invención se define por las reivindicaciones.

El listado de secuencias muestra:

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

La SEQ ID NO: 2 (no según la presente invención) muestra la secuencia de aminoácidos de un motivo de epítipo consenso de C-terminal de la proteína E7 de los subtipos de VPH 16 y

La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de aminoácidos del epítipo conformacional de C-terminal de la proteína E7 del VPH 16, en particular que comprende las posiciones 85 a 97 de la proteína E7 del VPH 16 y

La SEQ ID NO: 4 (no según la presente invención) muestra la secuencia de aminoácidos de un motivo de epítipo consenso de C-terminal de la proteína E7 de los subtipos de VPH 18 y

La SEQ ID NO: 5 (no según la presente invención) muestra la secuencia de aminoácidos del epítipo de N-

terminal de la proteína E7 del VPH 18, en particular que comprende las posiciones 5 a 13 de la proteína E7 del VPH 18 y

5 La SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos del epítipo conformacional de C-terminal de la proteína E7 del VPH 16 que comprende las posiciones 86 a 97 de la proteína E7 del VPH 16 y

La SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos del epítipo conformacional de C-terminal de la proteína E7 del VPH 16 que comprende las posiciones 86 a 98 de la proteína E7 del VPH 16 y

10 La SEQ ID NO: 8 (no según la presente invención) muestra la secuencia de aminoácidos del epítipo de N-terminal de la proteína E7 del VPH 18 que comprende las posiciones 4 a 13 de la proteína E7 del VPH 18 y

La SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de ADNc de la cadena pesada del anti-E7 del VPH 16

15 La SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de ADNc de la cadena ligera del anticuerpo anti-E7 del VPH 16.

Las figuras muestran:

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

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

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

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

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

La Figura 6 muestra la detección de la proteína E7 en muestras de LBC de mujeres sanas enriquecidas con células CaSki (VPH 16 positivas) y células U-2OS (VPH negativas). La citología basada en líquido se preparó a partir de un frotis de cuello uterino de un probando de Papll, que no produjo ninguna señal con el anticuerpo anti-E7 del VPH 16 de la presente invención. Tal como se indica, se agregaron 10.000 células de CaSki y de U-2OS a la muestra. Las células positivas para la E7 del VPH 16 se detectaron específicamente por inmunohistoquímica con anticuerpo anti-E7 del VPH 16 de la presente invención en un amplio intervalo de diluciones de anticuerpos, tal como se indica.

La Figura 7 muestra la especificidad del anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16 empleando un ELISA directo usando 2,5 y 10 ng de proteínas E7 del VPH recubiertas aleatoriamente de diferentes tipos de VPH detectados por el anticuerpo monoclonal biotinilado contra la E7 del VPH 16 (14 ng/100 µl) con el tampón como control.

La Figura 8A muestra la detección de las proteínas E7 del VPH 16 de tipo silvestre y varias mutadas expresadas de forma transitoria en células U-2OS por el anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16 (2 ng/µl) seguido de anticuerpo secundario marcado con alexaFlour488 en experimentos de inmunofluorescencia indirecta, (vector = vector de control vacío, TS = tipo silvestre). La Figura 8B muestra la detección de la proteína E7 del VPH 16 mutada de tipo silvestre, por anticuerpos policlonales anti-E7 del VPH 16 conocidos que no reconocen específicamente el epítipo conformacional en el dominio del dedo de zinc y, por lo tanto, también reconocen las mutaciones relativas a los restos de cisteína.

La Figura 9 muestra un modelo de la estructura de la proteína E7 del VPH 16 deducida de la estructura de RMN de la E7 del VPH 45, que contiene dos láminas β (β1 y β2) y dos α-hélices (α1 y α2) como estructuras secundarias. Se indican las cadenas laterales de las cuatro cisteínas (C58, C61, C91, C94) en los dos motivos CXXC que coordinan el zinc ubicado en el giro que conecta β1 y β2 y en la hélice α2 en C-terminal. Se indica el epítipo 86TLGIVCPICSQK97 (SEQ ID NO: 6) en el dedo de zinc de E7 en carboxilo terminal reconocido por el anticuerpo monoclonal. Además, se indica la localización de las mutaciones de C-terminal Δ52YNIVT56, Δ65LRL67, Δ75DIR77, Δ79LEDLL83, C58G y C91G. El extremo N-terminal no estructurado y las mutaciones H2P y C24G no están indicadas.

La Figura 10 muestra el mapeo de epítipos usando péptidos 13-meros sintéticos de la E7 del VPH 16 en micromatrices que fueron detectados por el anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16, dos anticuerpos de conejo no relacionados y el anticuerpo secundario solamente (anti-Cy5 de conejo). De manera específica, los péptidos 43 y 44 son reconocidos por el anticuerpo monoclonal anti-E7 del VPH 16 que comprende el epítipo específico.

La Figura 11 muestra la especificidad del anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 18 (no según la presente invención) empleando un ensayo ELISA. Las placas ELISA se recubrieron con una mezcla (1:1) de anticuerpos policlonales de cabra contra la E7 del VPH 16 y la E7 del VPH 18. Después, se añadieron 100 pg de proteína E7 recombinante de diferentes tipos de VPH. Posteriormente, se añadió el anticuerpo monoclonal biotinilado anti-E7 del VPH 18 para la detección de las proteínas E7 unidas por los anticuerpos policlonales de cabra, seguido de incubación con conjugado de estreptavidina-poli-HRP para visualización.

La Figura 12 muestra un análisis por transferencia de Western con proteína E7 purificada del VPH 16 y 18 (10 ng) cada una cargada en un gel SDS al 12,5 % y sondeada con el anticuerpo contra la E7 del VPH 18 (no de acuerdo con la presente invención), en donde solo la proteína E7 del VPH 18 es reconocida por el anticuerpo (panel izquierdo) y los extractos celulares de las células HeLa positivas para el VPH 18, las células CaSki positivas para el VPH 16 y las células U-2OS se separaron con un vector vacío o con un vector de expresión para la E7 del VPH 18. Los lisados celulares se separaron mediante SDS-PAGE y se sondearon en análisis por transferencia de Western con el anticuerpo contra la E7 del VPH 18 (panel derecho, no de acuerdo con la presente invención). Solo la proteína E7 del VPH 18 es reconocida por el anticuerpo.

La Figura 13 muestra el mapeo de epítipos usando péptidos sintéticos 11-meros de la E7 del VPH 18 que fueron detectados por el anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 18 (no de acuerdo con la presente invención), dos anticuerpos de conejo no relacionados y el anticuerpo secundario solamente (anti-Cy5 de conejo). De manera específica, los péptidos 1 a 3 son reconocidos por el anticuerpo monoclonal anti-E7 del VPH 18 (no según la presente invención) que comprende el epítipo específico.

Ejemplo 1

Generación y purificación de anticuerpos monoclonales de conejo (RabMab)

Las proteínas E7 del VPH 16 y del VPH 18 purificadas (pureza > 95 %; 4 mg cada uno) (Fiedler et al., J Gen Virol, 2005, 86, 3235-3241, y Fiedler et al., J Virol Methods, 2006, 134, 30-35) se usaron para inmunizar conejos, y se prepararon clones de hibridoma de conejo. Se tomaron hibridomas seleccionados en cultivo y se produjeron

sobrenadantes (2 1 cada uno), que normalmente produjeron 2 mg del respectivo RabMab. El sobrenadante de hibridoma se diluyó con 1/3 de tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM, pH 7) y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. La columna (HiTrap™ Protein G HP 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; eluido con 6x2 ml de elución, tampón (0,1 M de glicina-HCl, pH 2,7) en tubos de recolección con 80 µl de Tris-HCl 3 M, pH 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 contenían IgG se agruparon y se dializaron durante la noche a 4 °C contra el tampón de diálisis (fosfato de potasio 166 mM, glicina 83 mM, pH 7,2). Después de la diálisis, las muestras se concentraron utilizando tubos de concentración (Amicon Ultra, MWCO 10.000 Millipore). Por último, la muestra se eliminó por centrifugación (13.000 rpm, 4 °C, 10 min) y la concentración de IgG se determinó usando DO a 280 nm. Las alícuotas se almacenaron en nitrógeno líquido.

Los clones de hibridoma que producen los anticuerpos deseados se seleccionaron después de más pruebas y un clon de hibridoma que produce anticuerpos monoclonales anti-E7 del VPH 16 se ha depositado el 16 de diciembre de 2009 con el DSMZ, Braunschweig, Alemania, bajo e n.º de registro DSM ACC 3034 y un segundo clon de hibridoma que produce anticuerpos monoclonales anti-E7 del VPH 18 (no según la presente invención) se han depositado el 16 de diciembre de 2009 con el DSMZ bajo el n.º de registro DSM ACC 3035.

Ejemplo 2

Prueba de reactividad cruzada para anticuerpos de E7

Sobreexpresión en células U-2OS

Las células U-2OS (VPH negativas) se transfectaron transitoriamente con vectores para la sobreexpresión de proteínas E7 seleccionadas. Para 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 1 % (p/v) de albúmina de suero bovino/PBS, las células se incubaron durante 1 h con el monoclonal anti-E7 del VPH 16 de la presente invención o anti-E7 del VPH 18 (no según la presente invención) (25 µg/ml) a temperatura ambiente y se analizaron por microscopía confocal.

Los resultados mostraron que el anticuerpo anti-E7 del VPH 16 de la presente invención no reaccionó de forma cruzada con proteínas E7 de otros tipos de VPH, tales como el VPH 18 y el VPH 45, y el anticuerpo anti-E7 del VPH 18 (no según la presente invención) pudo detectar proteínas E7 del VPH 18 y 45, 11, 56, 58, 59 y 70.

Ensayo ELISA directo

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

El ensayo se llevó a cabo del modo siguiente:

Los pocillos de placas de microtitulación (Maxisorp F, Nunc, Viena) se recubrieron durante la noche (4 °C) con diferentes cantidades (2,5 y 10 ng) de proteínas E7 del VPH recombinantes sin marcar producidas por vía bacteriana en 100 µl de tampón de recubrimiento (NaHCO₃ 0,1 M, pH 9,6). Después de lavar tres veces en PBS, pH 7,4, que contiene Tween20 al 0,05 %, los pocillos se bloquearon con 300 µl de diluyente/bloqueador universal de caseína (UCDB, SDT, Baesweiler, Alemania) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces. Se añadieron 100 µl de anticuerpo monoclonal primario biotinilado contra la E7 del VPH 16 (dilución apropiada en UCDB) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado, se añadieron 100 µl de conjugado de estreptavidina-PolyHRP40 (SDT, Baesweiler Alemania, 0,2 µg/ml en UCDB) a cada pocillo, seguido de 1 hora de incubación a temperatura ambiente. Después de lavar seis veces, la unión exitosa del anticuerpo se visualizó mediante la adición de 100 µl de sustrato cromogénico (es(HS)TMB, SDT, Baesweiler, Alemania) a cada pocillo e incubación de seguimiento durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de 2N H₂SO₄ y se cuantificó por medición de absorbancia (450 nm) en un lector de placas de múltiples marcadores (VICTOR TM X5, Perkin Elmer, Viena, Austria).

Tal como se muestra en la Figura 7, el anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16 detectó muy fuertemente la proteína E7 del VPH 16, pero no reaccionó de forma cruzada con todos los demás tipos de VPH, incluidos otros diez genotipos de VPH de alto riesgo y los dos virus de VPH de bajo riesgo más comunes, VPH 6 y VPH 11.

Ensayo ELISA

Para caracterizar con mayor precisión la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 18 (no según la presente invención) se usó un ensayo ELISA (véase el ejemplo 5 para el protocolo ELISA). Se añadieron a los pocillos 100 pg de las respectivas proteínas recombinantes E7 de del VPH y se detectaron con el anticuerpo anti-

E7 del VPH 18 (no de acuerdo con la presente invención).

Este experimento demostró que el anticuerpo monoclonal anti-E7 del VPH 18 (no según la presente invención) es altamente específico para las proteínas E7 del VPH 18 y 45 (véase la figura 11) pero no reconoce las proteínas E7 de otros VPH de tipos de alto riesgo.

Análisis por transferencia de Western

La especificidad del anticuerpo anti-E7 del VPH 18 (no según la presente invención) también se analizó mediante análisis por transferencia de Western. La proteína E7 recombinante purificada de los tipos de VPH 16 y 18 se separó por SDS-PAGE y se analizó mediante análisis por transferencia de Western usando el anticuerpo anti-E7 del VPH 18. No se obtuvo señal para la proteína recombinante E7 del VPH 16, mientras que se obtuvieron señales positivas para la proteína recombinante E7 del VPH 18 (Figura 12). De manera similar, se obtuvieron señales específicas con el anticuerpo anti-E7 del VPH 18, cuando se analizaron extractos de células U-2OS transfectadas transitoriamente, que expresan versiones marcadas con FLAG de la E7 del VPH 18. Por último, las proteínas E7 endógenas de células HeLa positivas para VPH 18, pero no de células CaSki positivas para VPH-16, fueron detectables por análisis por transferencia de Western (Figura 12).

Ejemplo 3

Detección inmunohistoquímica de la proteína E7 del VPH en biopsias de cáncer de cuello uterino

Para determinar el estado del VPH en biopsias de cuello uterino de 30 pacientes, en primer lugar, se utilizó el análisis de PCR para determinar los diferentes genotipos de VPH. 26 (87 %) de las biopsias fueron positivas para el ADN del VPH, nueve (30 %) contenían solo ADN del VPH 16 y tres (10 %) solo ADN del VPH 18. Ocho (23 %) eran positivas para VPH 16 y 18 y seis (23 %) contenían VPH 16, 18 y otros tipos de VPH. En las cuatro biopsias restantes, el tipo de VPH aparentemente no fue detectable por el análisis de PCR. Como controles negativos, se usaron 22 biopsias de cuello uterino que contienen epitelios normales, escamosos y glandulares. Para probar si los anticuerpos monoclonales de conejo anti-E7 del VPH 16 y anti-E7 del VPH 18 (no según la presente invención) podían detectar las proteínas E7 del VPH en secciones de parafina de estas biopsias, se empleó el siguiente protocolo para inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica se realizó en secciones de tejido embebido en parafina derivadas de biopsias de cuello uterino. Se montaron secciones de 2 μm en portaobjetos, se desparafinaron en xileno (2 x 12 minutos), se rehidrataron y se procesaron para la recuperación de antígeno mediante tratamiento durante 1 hora en un vaporizador en solución de recuperación de objetivo (DAKO S1700) para la detección de la E7 del VPH. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó por incubación en 20 % de H_2O_2 /metanol durante 30 minutos. Las secciones se lavaron e incubaron durante 15 minutos en tampón de bloqueo (10% de suero de cabra o conejo de DAKOCytomation Alemania, respectivamente, BSA al 5 % en tampón Tris a 1x). Se eliminó la solución de bloqueo. Las secciones se incubaron con los anticuerpos monoclonales biotinilados de conejo anti-E7 del VPH 16 o E7 del 18 (no según la presente invención) (a diluciones apropiadas) durante 1 hora a temperatura ambiente en BSA al 5% / TBS a 1x en una cámara húmeda. Las muestras se enjuagaron en Tris a 1x / Tween20 al 0,1 % y se incubaron con IgG secundarias (DAKOCytomation, Alemania) durante 45 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después del lavado, las muestras se incubaron con conjugado de estreptavidina peroxidasa (Sigma, Viena) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos se visualizaron con solución de DAB (Sigma, Viena) como sustrato. La contratinción se realizó con Hemalaun (Merck, Viena). Las muestras se deshidrataron y se montaron usando Entellan (Merck, Viena). La microscopía Brightfield con fotografía se realizó con el microscopio Olympus CH30 y una cámara Sony DSC-W15 Cybershot.

En las 23 biopsias que resultaron positivas para el ADN del VPH 16 mediante el análisis de PCR, el anticuerpo anti-E7 del VPH 16 de la presente invención reconoció casi todas las células tumorales epiteliales dentro de los islotes tumorales pero no tiñó las células en los tejidos conectivos adyacentes. No se detectó la proteína E7 del VPH 16 en muestras normales de cuello uterino, ni en tejido conectivo y epitelios glandulares de cuello uterino ni en epitelios escamosos normales de cuello uterino.

Para determinar si la proteína E7 del VPH 18 podía ser detectada por el anticuerpo anti-E7 del VPH 18 (no de acuerdo con la presente invención), se realizaron experimentos de inmunohistoquímica usando las biopsias positivas para el ADN del VPH 18 mediante el análisis de PCR. Similar al anticuerpo anti-E7 del VPH 16, el anticuerpo anti-E7 VPH 18 tiñó casi todas las células tumorales dentro de los tumores respectivos, pero no tiñó las células en el tejido conectivo adyacente. No se detectó tinción en muestras normales de cuello uterino.

Sorprendentemente, el anticuerpo anti-E7 del VPH 16 así como el anticuerpo anti-E7 del VPH 18 (no de acuerdo con la presente invención) podrían detectar la proteína respectiva en las cuatro biopsias en las que el ADN del VPH no era detectable por el análisis de PCR, lo que sugiere que las células de estas biopsias estaban infectadas por el VPH que no fue detectado por el análisis de PCR.

Ejemplo 4

Detección de proteínas E7 del VPH 16 de alto riesgo en citología líquida

5 Según los resultados obtenidos con las secciones de parafina, se probó si el anticuerpo anti-E7 del VPH 16 según la presente invención puede usarse en citología líquida (LBC, por sus siglas en inglés). Para establecer el procedimiento, las muestras de LBC de mujeres sanas se enriquecieron con células CaSki (VPH 16 positivas) y células U-2OS (VPH negativas) y se procesaron de acuerdo con el siguiente protocolo:

10 se recolectaron las células CaSki y las células U-2OS y se resuspendieron en tampón ThinPrep-Buffer (Cytoc SA, Ginebra, Suiza). Los hisopos de cuello uterino se resuspendieron en tampón ThinPrep-Buffer, se mezclaron con las células cultivadas, y se pipetearon de 10 a 100 µl de la mezcla en un portaobjetos de vidrio ThinPrep (Cytoc SA, Ginebra, Suiza). Las células se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente. Las células se fijaron usando PFA al 4 % a temperatura ambiente durante 30 minutos en una cubeta, y se lavaron agitando suavemente 2 x 5 minutos a TA en TBS + Tween20 al 0,05 %. Para la recuperación de antígeno, las células se incubaron con citrato de Na 10 mM a pH 6,0 + TritonX100 al 0,3 % durante 15 min a TA en una cubeta, se lavaron 2 x 5 min a TA en TBS + Tween20 al 0,05 %. Después del bloqueo de peroxidasa, los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos con 200 µl de suero de cabra normal (DakoCytomation) en una cámara húmeda (dilución a 1:10 en BSA-TBS al 1 % + Tween20 al 0,05 %). Cada portaobjetos se incubó con 200 µl de anticuerpo primario a una dilución apropiada en BSA-TBS al 1 % + Tween20 al 0,05 % durante 1 hora a TA en una cámara húmeda. Los portaobjetos se lavaron e incubaron con anticuerpo secundario biotinilado (DakoCytomation) a una dilución apropiada en BSA-TBS al 1 % + Tween20 al 0,05 % durante 1 hora a TA. Los portaobjetos se lavaron y se incubaron con 200 µl de conjugado de peroxidasa (Sigma; dilución de 1:500 en BSA-TBS al 1 % + Tween20 al 0,05 %) en una cámara húmeda, y posteriormente se enjuagaron en agua destilada. Para la visualización, se usó kit de sustrato de peroxidasa SK-4200AEC-Kit (Vector, Viena, Austria). La hematoxilina sirvió como contratincción.

25 Este procedimiento produjo una tinción muy específica de las células CaSki positivas para VPH 16 con el anticuerpo anti-E7 del VPH 16 de la presente invención, mientras que ni las células de cuello uterino de probandos sanos, ni las células U-2OS se tiñeron, lo que sugiere una especificidad muy alta del anticuerpo (véase la figura 6).

30 Ejemplo 5

Diagnóstico de VPH basado en ELISALisis celular

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

40 En el caso de muestras clínicas, se recogieron frotis del cuello uterino con un cepillo. El cepillo se colocó inmediatamente en el tubo colector que contenía 1 ml de tampón de lisis sin inhibidores de la proteasa (PBS-Tween20 al 0,1 %). Después de acortar el palo del cepillo y cerrar el tubo colector, la muestra se almacenó inmediatamente a -80 °C hasta su uso. La muestra se descongeló a temperatura ambiente e inmediatamente se añadieron 20 µl de solución madre de inhibidor de proteasa a 50x (completa sin EDTA, Roche) por tubo colector. Después de resuspender la muestra restante en el cepillo mezclándola en el tampón de lisis, el líquido restante del cepillo se limpió en el borde del tubo y el cepillo se desechó. La muestra se centrifugó a 4 °C, 13.000 rpm por 20 min. Los sobrenadantes se procesaron en el procedimiento ELISA.

50 Protocolo ELISA

Se añadieron 100 µl de tampón de recubrimiento (NaHCO₃ 0,1 M, a pH 9,6) que contenía una mezcla de anticuerpos policlonales de cabra anti-VPH de alto riesgo a cada pocillo de una placa de 96 pocillos (F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate), y se incubó durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado (PBS, Tween 20 al 0,05%; a pH 7,4); se añadieron 300 µl de tampón de bloqueo (Diluyente/Bloqueador Universal de Caseína, SDT) a cada pocillo, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado, luego se añadió proteína E7 recombinante o lisado celular (200 µl; diluido en tampón de lisis: PBS, Tween al 0,1%, inhibidores de la proteasa) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiraron los pocillos y nuevamente se añadieron 200 µl de proteína o lisado celular y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de anticuerpo monoclonal de detección biotinilado (anticuerpo anti-E7 del VPH 16 de la presente invención o anticuerpo anti-E7 del VPH 18) en su dilución apropiada en Diluyente/Bloqueador Universal de Caseína, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con tampón de lavado. Se agregaron a cada pocillo 100 µl de conjugado SA-PolyHRP (SDT) en su dilución apropiada en diluyente/bloqueante universal de caseína y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los pocillos se lavaron 6 veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de reactivo de detección (es(HS)TMB, SDT) a cada pocillo, se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad

a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de solución de parada (2N H₂SO₄) a cada pocillo, y se determinó la absorbancia (450 nm) mediante un lector ELISA.

Resultados

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

15 Cuando los anticuerpos monoclonales de detección de la presente invención se biotinilaron y se incubaron con conjugado de estreptavidina-poli-HRP en lugar de un anticuerpo secundario, se pudo lograr una amplificación de señal adicional. En esta configuración optimizada, el límite de detección específico de los anticuerpos monoclonales se redujo a 500 fg - 1 pg en el caso de la E7 del VPH 16 (según la presente invención) y a 250 fg - 500 fg para la proteína E7 del VPH 18 (véase la figura 2).

20 Con esta configuración, también se podría demostrar que las proteínas de los VPH de bajo riesgo como el VPH 6 o el VPH 11 no son detectadas por el anticuerpo anti-E7 del VPH 16 de la presente invención o el anticuerpo anti-E7 del VPH 18 (véase la figura 3).

25 Para determinar, si este formato ELISA es adecuado para la detección de proteínas E7 en células tumorales, las células negativas para VPH (U-2OS) se mezclaron con cantidades decrecientes de células HeLa (VPH 18 positivas) y células CaSki (VPH 16 positivas), respectivamente. Las mezclas de células se lisaron y analizaron mediante ELISA (véase más arriba). Estos experimentos revelaron que el respectivo anticuerpo puede detectar 2.500 - 5.000 células CaSki, así como 500 - 1.000 células HeLa (en el fondo de las células U-2OS negativas para el VPH) (véase la figura 4).

30 Para determinar, si las proteínas E7 también podrían detectarse en muestras clínicas con esta configuración, se probaron frotis de cuello uterino. Para este fin, se tomaron dos pruebas de Papanicolaou consecutivas de pacientes o probandos sanos. Se usó una muestra para la clasificación citológica de acuerdo con Papanicolaou y la posterior determinación del subtipo de VPH por análisis de PCR. La segunda muestra se procesó para el protocolo ELISA (véase anteriormente). En total, se procesaron cinco muestras (una positiva en VPH 16, una positiva en VPH 18 y tres de negativas en VPH), produciendo señales claras sobre el fondo usando los anticuerpos para las muestras positivas para VPH 16 y 18 (no según la presente invención), mientras que las muestras negativas para el VPH no produjeron una señal detectable. Estos datos muestran que la sensibilidad del presente ensayo que emplea los anticuerpos de la presente invención es lo suficientemente alta como para permitir la detección confiable de proteínas E7 de alto riesgo en muestras clínicas y, por lo tanto, permite un diagnóstico fiable de infecciones por VPH de alto riesgo (véase la figura 5).

40 Ejemplo 6

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

45 Para investigar más a fondo la especificidad del anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16 para su epítipo en el dominio C-terminal, las células U-2OS se transfectaron transitoriamente con vectores de expresión para mutantes de la E7 del VPH 16 que se dirigen al N-terminal no estructurado, así como a la determinación de la estructura principal elementos en el dominio C-terminal. El análisis preliminar por transferencia de Western mostró que los niveles de proteína de todos los mutantes E7 del VPH 16 eran similares o superiores al nivel de la proteína E7 de tipo silvestre del VPH 16. Para investigar si el anticuerpo monoclonal anti-E7 del VPH 16 es capaz de reconocer los mutantes de E7 del VPH 16, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con las células U-2OS transfectadas transitoriamente. Las proteínas mutantes E7 del VPH 16 analizadas fueron: H2P (cambio del resto de histidina n.º 2 a prolina), C24G (cambio del resto de cisteína n.º 24 a glicina), deleciones en la lámina β1 (Δ52YNIVT56), la lámina β2 (Δ65LRL67) y la hélice α1 (Δ75DIR77 y Δ79LEDLL83), así como mutaciones puntuales en el sitio de coordinación de zinc del dominio del dedo de zinc (C58G, C91G y C58G/C91G). Las posiciones de las mutaciones dentro de la proteína E7 del VPH 16 también se indican en la figura 9.

60 Tal como se muestra en la figura 8A, el anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16 reconoció a todos los mutantes por deleción, pero no pudo reconocer las mutaciones puntuales relacionadas con los restos de cisteína del sitio de coordinación de zinc. Esto indica que el epítipo reconocido se encuentra en la estructura del dedo de zinc y, más importante aún, un dominio intacto de dedos de zinc, que no se puede formar si uno o más de los restos de cisteína están mutados, es necesario para el reconocimiento eficaz de la proteína E7 del VPH 16 por el anticuerpo monoclonal anti-E7 del VPH 16. Por el contrario, tal como se muestra en la Figura 8B, los anticuerpos policlonales conocidos contra la E7 del VPH 16 que no reconocen el epítipo conformacional específico reconocido por el anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16 también pueden detectar las mutaciones relacionadas con los restos de cisteína del dominio del dedo de zinc.

Para los experimentos de inmunofluorescencia indirecta se utilizó el siguiente protocolo:

Las células se fijaron con PFA al 4 % (p/v) / PBS a 1x, se permeabilizaron con citrato de Na al 0,1 % (p/v) / Triton-X-100 al 0,3 % (v/v), se bloquearon con PBS a 1x / BSA al 1 % y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con el anticuerpo anti-E7 del VPH 16 en PBS a 1x / BSA al 1 %. Después de lavar en PBS a 1x y teñir con el anticuerpo secundario marcado con alexaFlour488 (DAKOCytomation, Hamburgo), Las células se procesaron para microscopía de inmunofluorescencia indirecta y se visualizaron utilizando un sistema de escaneo láser confocal.

Ejemplo 7

Mapeo de epítomos

Los epítomos HPV 16 E7 fueron analizados por JPT Peptide Technologies GmbH (Berlín, Alemania) usando micromatrices de péptidos. Para hacer esto, se incubó una colección de 44 péptidos 13-meros diferentes derivados de la E7 del VPH 16 diferentes, colocada en micromatrices de péptidos, con el anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16 y anticuerpos de control de conejo no relacionados. La determinación de la unión del péptido-anticuerpo se realizó mediante análisis RepliTope donde la micromatriz de péptidos se incubó con el anticuerpo primario seguido de un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia (anti-conejo-Cy5). Después del lavado, las micromatrices de péptidos se secaron usando una centrifuga de micromatrices y se escanearon en un sistema de escaneo de micromatrices de alta resolución con ajustes de longitud de onda apropiados.

Tal como se muestra en la Figura 10, los péptidos 43 y 44 que comprenden los aminoácidos 85 a 97 (SEQ ID NO: 3) y 86 a 98 (SEQ ID NO: 7), respectivamente, están específicamente reconocidos por el anticuerpo monoclonal contra la E7 del VPH 16, indicando que estos aminoácidos representan el epítomo reconocido.

De manera similar, se usó una colección de 47 péptidos 11-meros superpuestos derivados de diferentes E7 del VPH 18 para el mapeo de epítomos para el anticuerpo anti-E7 del VPH 18 (no de acuerdo con la presente invención). Las micromatrices de péptidos se incubaron con el anticuerpo anti-E7 del VPH 18, así como con dos anticuerpos monoclonales no relacionados.

Tal como se muestra en la Figura 13, los péptidos 1 a 3 que comprenden los aminoácidos N-terminales 4 a 13 de la proteína E7 del VPH 18 se reconocen específicamente por el anticuerpo anti-E7 del VPH 18 (no según la presente invención).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AWS

<120> E7 Antikörper

<130> 205710

<150> EP10011978

<151> 30/09/2010

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> E7 del VPH subtipos 16 y 18

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 1

Val Cys Pro Xaa Cys

1

5

ES 2 778 654 T3

5 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> E7 del VPH subtipos 16

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 2

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

20 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> HPV16-E7

25 <400> 3

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

30 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> E7 del VPH subtipo 18

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45 <400> 4

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

50 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> HPV18-E7

<400> 5

Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu
 1 5

55

ES 2 778 654 T3

5 <210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> HPV16-E7

<400> 6

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

10 <210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> HPV16-E7

15 <400> 7

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

20 <210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> E7 del VPH 18

25 <400> 8

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

30 <210> 9
<211> 1380
<212> ADN
<213> Cadena pesada del anticuerpo anti-E7 del VPH16

35 <400> 9

ES 2 778 654 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcgctggagg agtcoggggg tcgcctggta acgcctggag ggtccctgac 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 tgtgcccgctg cctacgatga atatggtatt 360
 catgcttttc atccctgggg cccaggcacc ctgggtcaccg tctcctcagg gcaacctaaag 420
 gctccatcag tcttcccact ggccccctgc tgcggggaca caccagctc cacggtgacc 480
 ctgggctgcc tgggtcaaagg gtacctcccg gagccagtga ccgtgacctg gaactcgggc 540
 acctcacca atggggtagc caccttcccg tccgtccggc agtcctcagg cctctactcg 600
 ctgagcagcg tgggtgagcgt gacctcaagc agccagcccg tcacctgcaa cgtggcccac 660
 ccagccacca acaccaaagt ggacaagacc gttgocccct cgacatgcag caagcccacg 720
 tgcccacccc ctgaactcct ggggggaccg tctgtcttca tcttcccccc aaaaccaag 780
 gacacctca tgatctcagc ccccccgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccag 840
 gatgaccccc aggtgcagtt cacatggtac ataaacaacg agcaggtgcg caccgcccgg 900
 ccgccgctac gggagcagca gttcaacagc acgatccgcg tggtcagcac cctccccatc 960
 gcgcaccagg actggctgag gggcaaggag ttcaagtgca aagtccaca caaggcactc 1020
 ccggccccca 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 tgcacaacca ctacacgcag aagtccatct cccgctctcc gggtaaatga 1380

<210> 10
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Cadena ligera de anticuerpo anti-E7 del VPH16
 <400> 10

5

ES 2 778 654 T3

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc	60
acatttgccc aagtgctgac ccagactcca tcccctgtgt ctgcagctgt 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 tcaaaggtga tccagttgca	420
cctactgtcc tcacttccc accagctgct gatcaggtgg caactggaac agtcaccatc	480
gtgtgtgtgg cgaataaata ctttcccgat gtcaccgtca cctgggaggt ggatggcacc	540
acccaaaca ctggcatcga gaacagtaaa acaccgcaga attctgcaga ttgtacctac	600
aacctcagca gcactctgac actgaccagc acacagtaca acagccacaa agagtacacc	660
tgcaaggtga cccagggcac gacctcagtc gtccagagct tcaatagggg tgactgttag	720

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular de hibridoma, que tiene un n.º de registro DSM ACC3034.
- 5 2. Un anticuerpo monoclonal, que se puede obtener del sobrenadante de la línea celular de hibridoma según la reivindicación 1.
3. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo está marcado con un agente radiactivo, o un grupo enzimático o fluorescente.
- 10 4. Una composición de diagnóstico, que comprende el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 como agente activo.
- 15 5. Un kit de diagnóstico, que comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 2 como primer agente y anticuerpos dirigidos contra las proteínas E7 del VPH como segundo agente.
6. Un método *in vitro* para la detección de la proteína E7 del VPH 16, que comprende
 - 20 i) incubar una muestra biológica con el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 y
 - ii) medir y/o detectar la proteína E7 del VPH 16 en la muestra biológica midiendo y/o detectando el anticuerpo específicamente unido a la proteína E7.
7. Un método *in vitro* para el diagnóstico inmunológico, preferentemente inmunohistoquímico o inmunofluorescente de infecciones por VPH 16, que comprende
 - 25 a) incubar una muestra biológica con el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 y
 - b) detectar la proteína E7 del VPH 16 en la muestra biológica detectando el anticuerpo unido específicamente a la proteína E7 y permitiendo así el diagnóstico de una infección por el VPH 16.
- 30 8. Un método *in vitro* para el diagnóstico basado en ELISA de infecciones por VPH 16, que comprende
 - aa) recubrir un soporte con anticuerpos de captura dirigidos contra las proteínas E7 del VPH,
 - bb) añadir una muestra biológica al soporte recubierto,
 - 35 cc) incubar el soporte con el anticuerpo de detección monoclonal según la reivindicación 2
 - dd) identificar la proteína E7 del VPH 16 unida específicamente por los anticuerpos de captura detectando el anticuerpo monoclonal de detección específicamente unido a la proteína E7 y permitiendo así el diagnóstico de una infección por el VPH 16.
9. Uso del anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 para la preparación de una composición de diagnóstico para la detección *in vitro* de la proteína E7 del VPH 16 en una muestra biológica.
- 40 10. Uso del anticuerpo monoclonal según la reivindicación 9, en donde el anticuerpo está unido, enlazados y/o anclados a un soporte sólido.
- 45 11. Un método para la preparación de una composición de diagnóstico, que comprende la etapa de formular el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 con un vehículo, un diluyente, un tampón o una solución de almacenamiento aceptables.
- 50 12. Uso de una composición de diagnóstico que comprende el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 para la detección inmunológica, preferentemente basada en ELISA, de la proteína E7 del VPH 16 en una muestra biológica, en donde el anticuerpo está unido, enlazado y/o anclado a un soporte sólido.

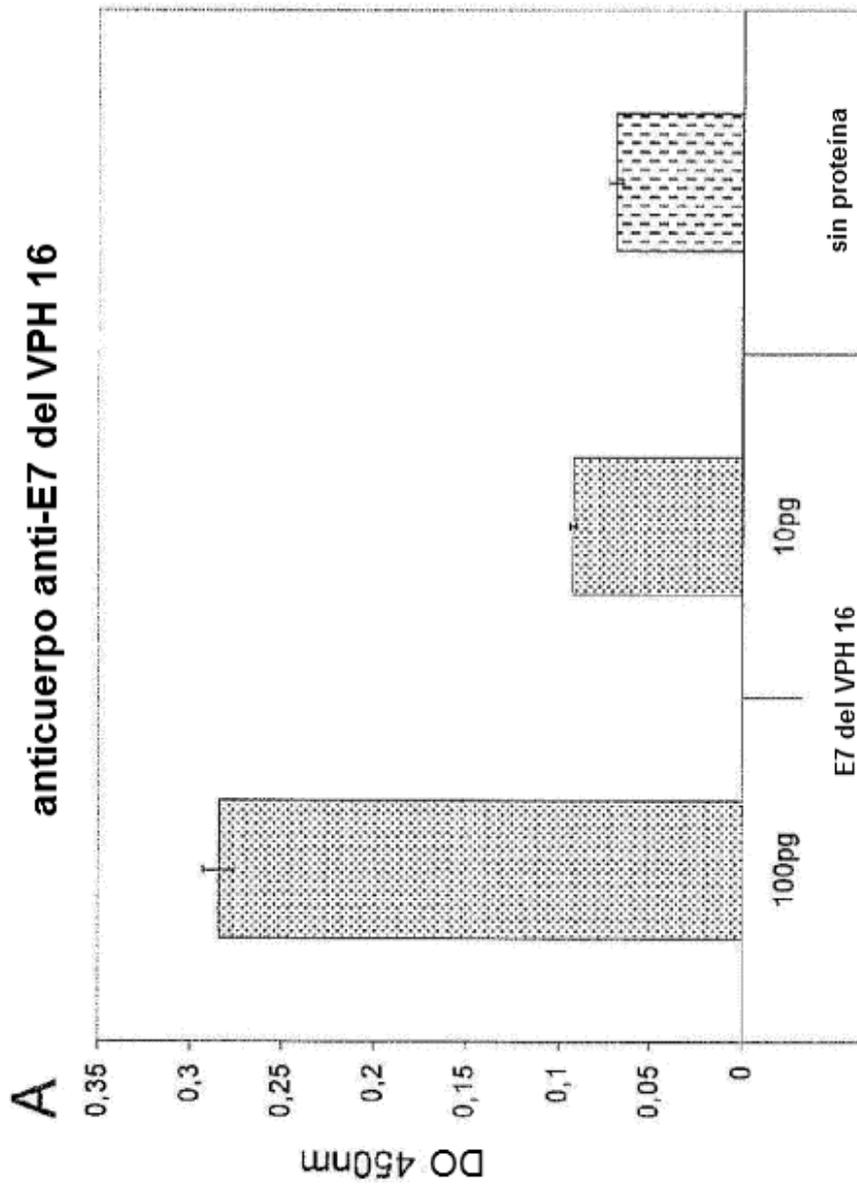


Figura 1

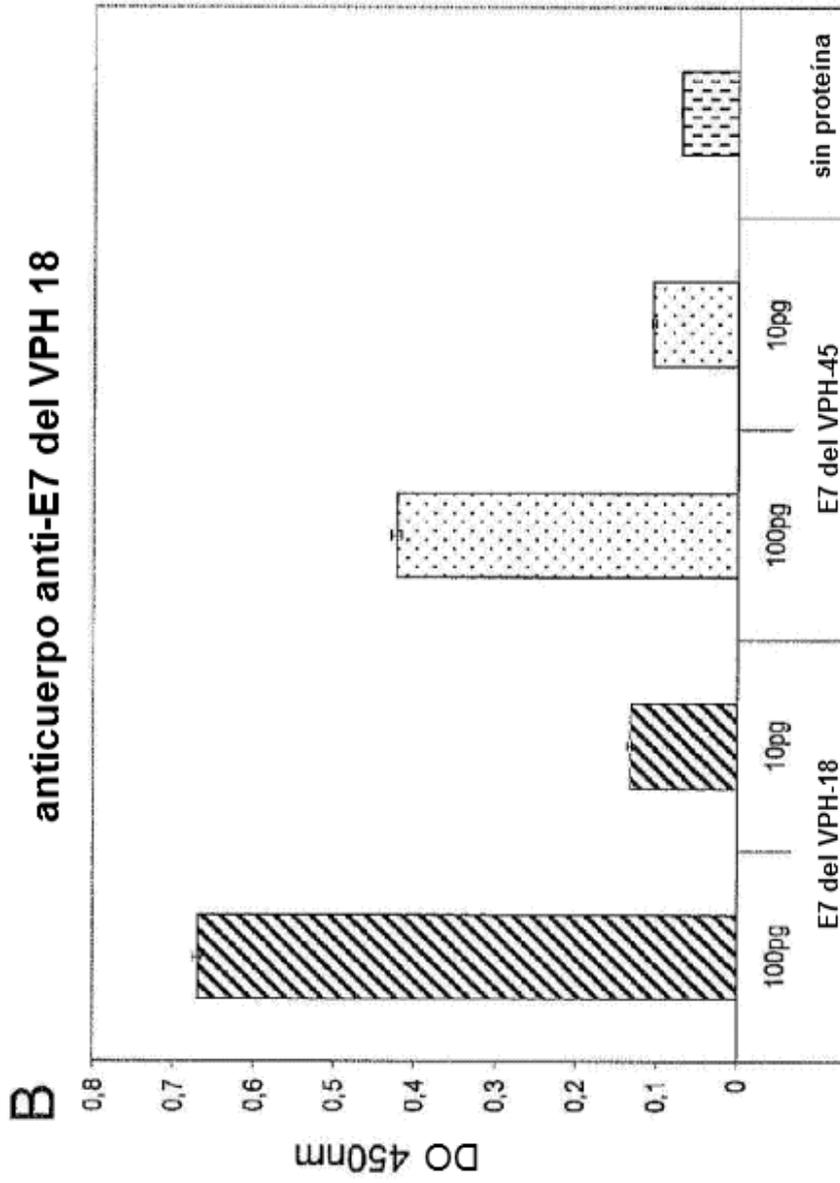


Figura 1

Figura 2

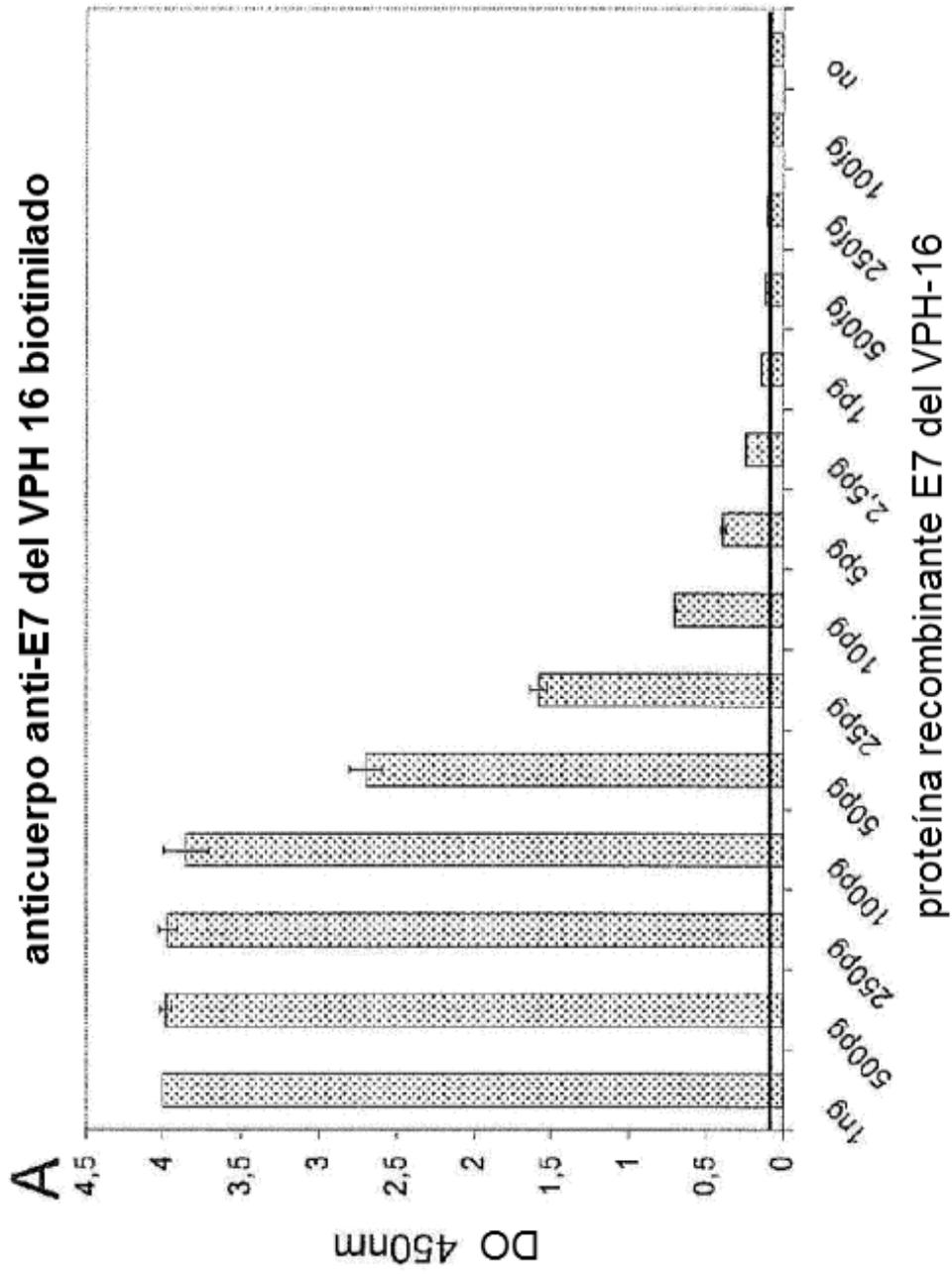


Figura 2

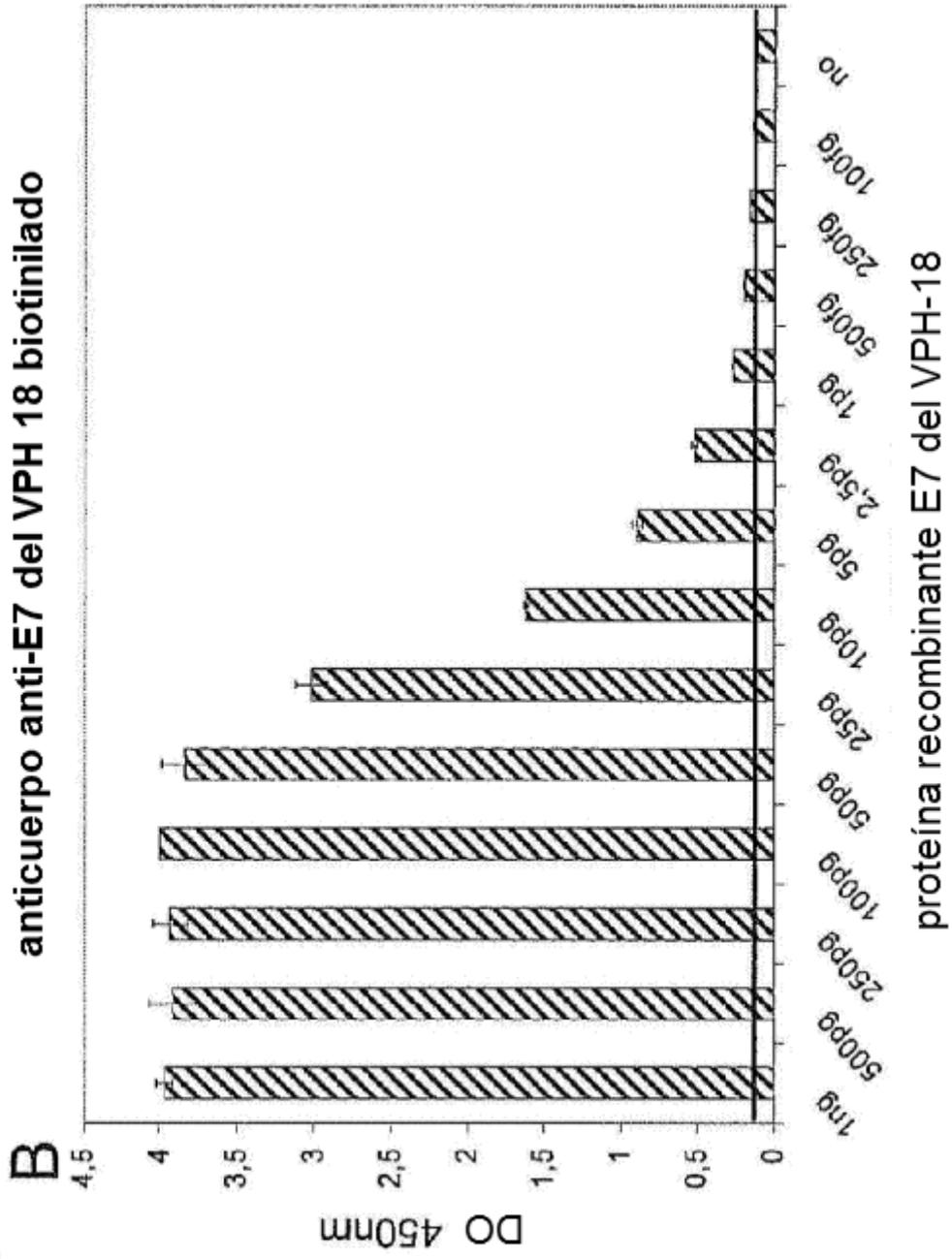
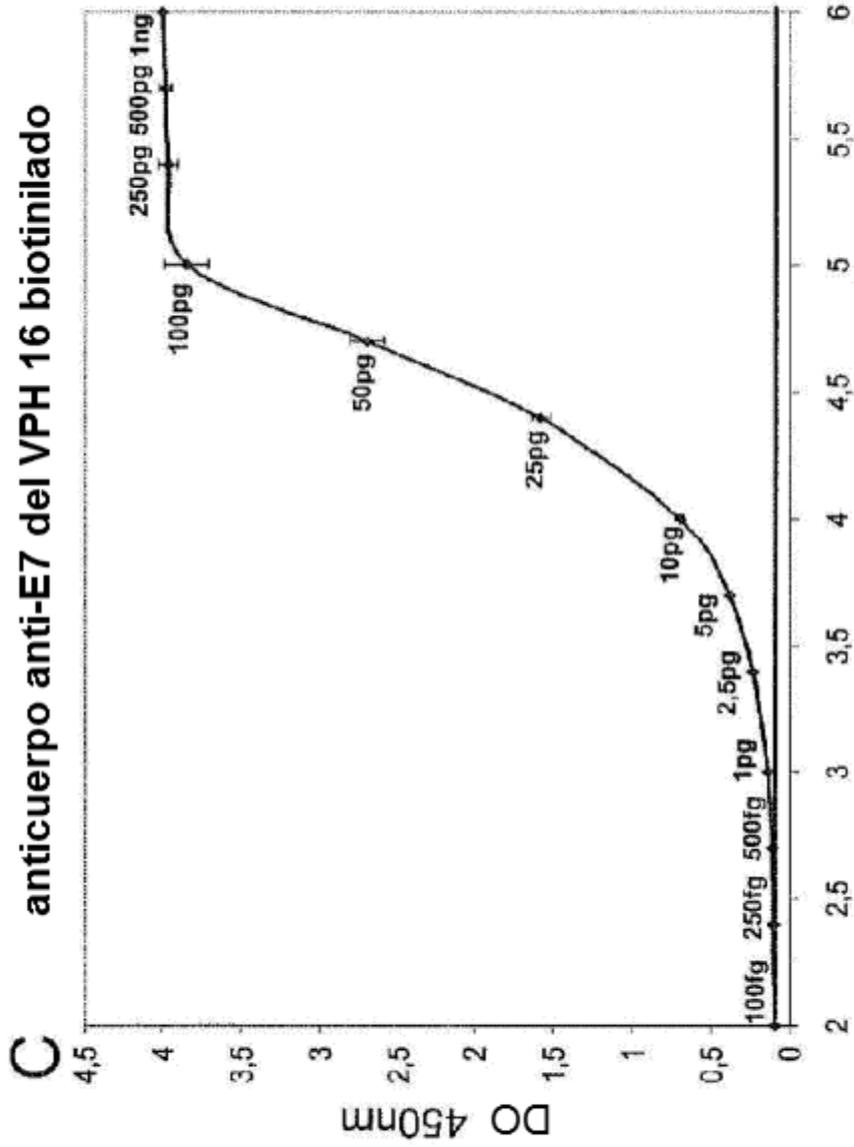
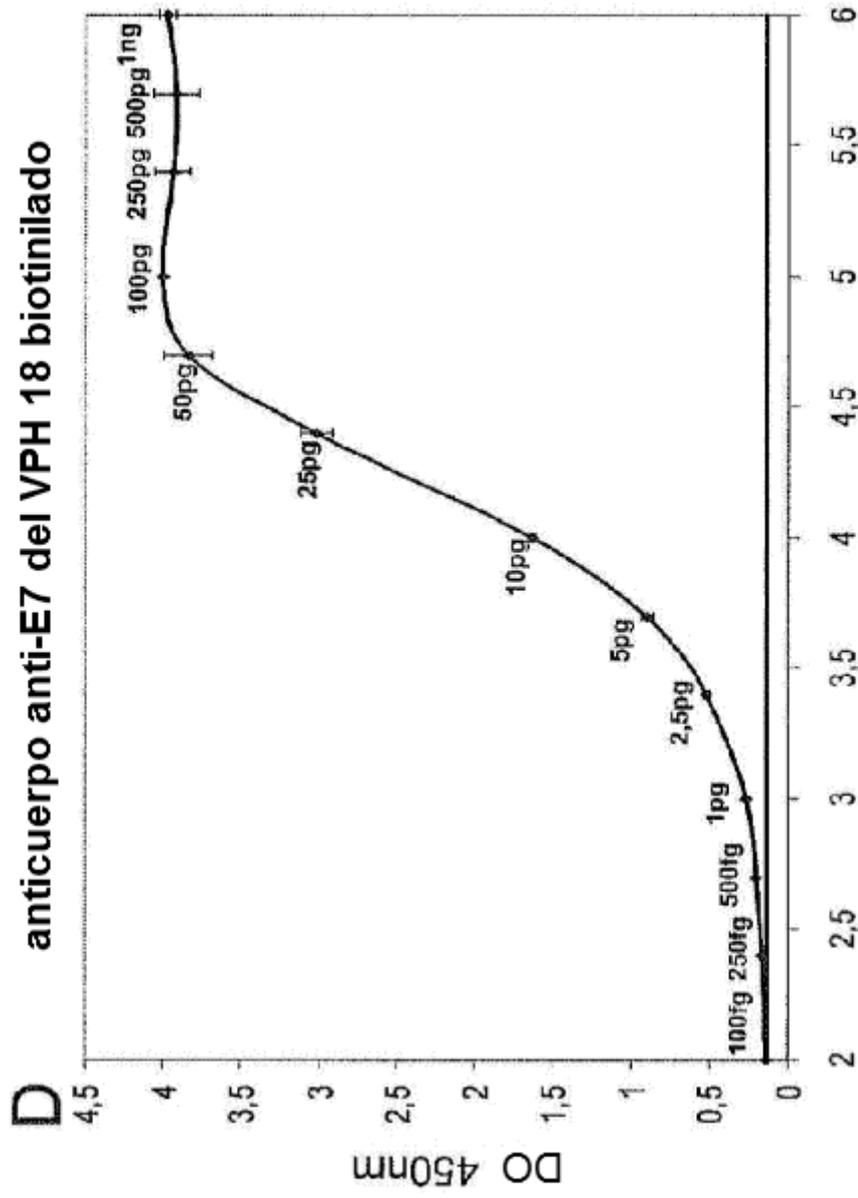


Figura 2



log10 de la concentración de proteína recombinante E7 del VPH-16 (fg)

Figura 2



log10 de la concentración de la proteína recombinante E7 del VPH-18 (fg)

Figura 3

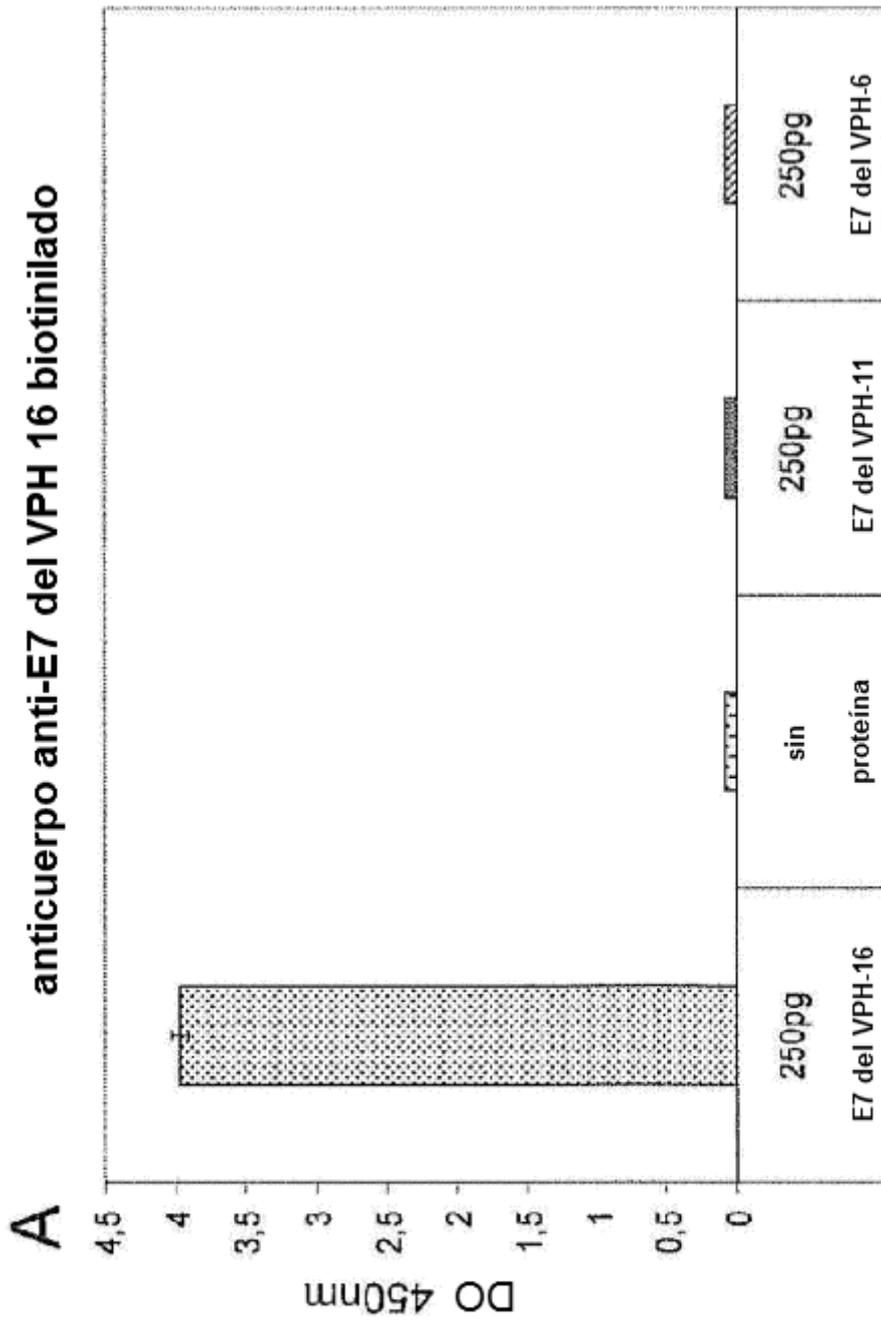


Figura 3

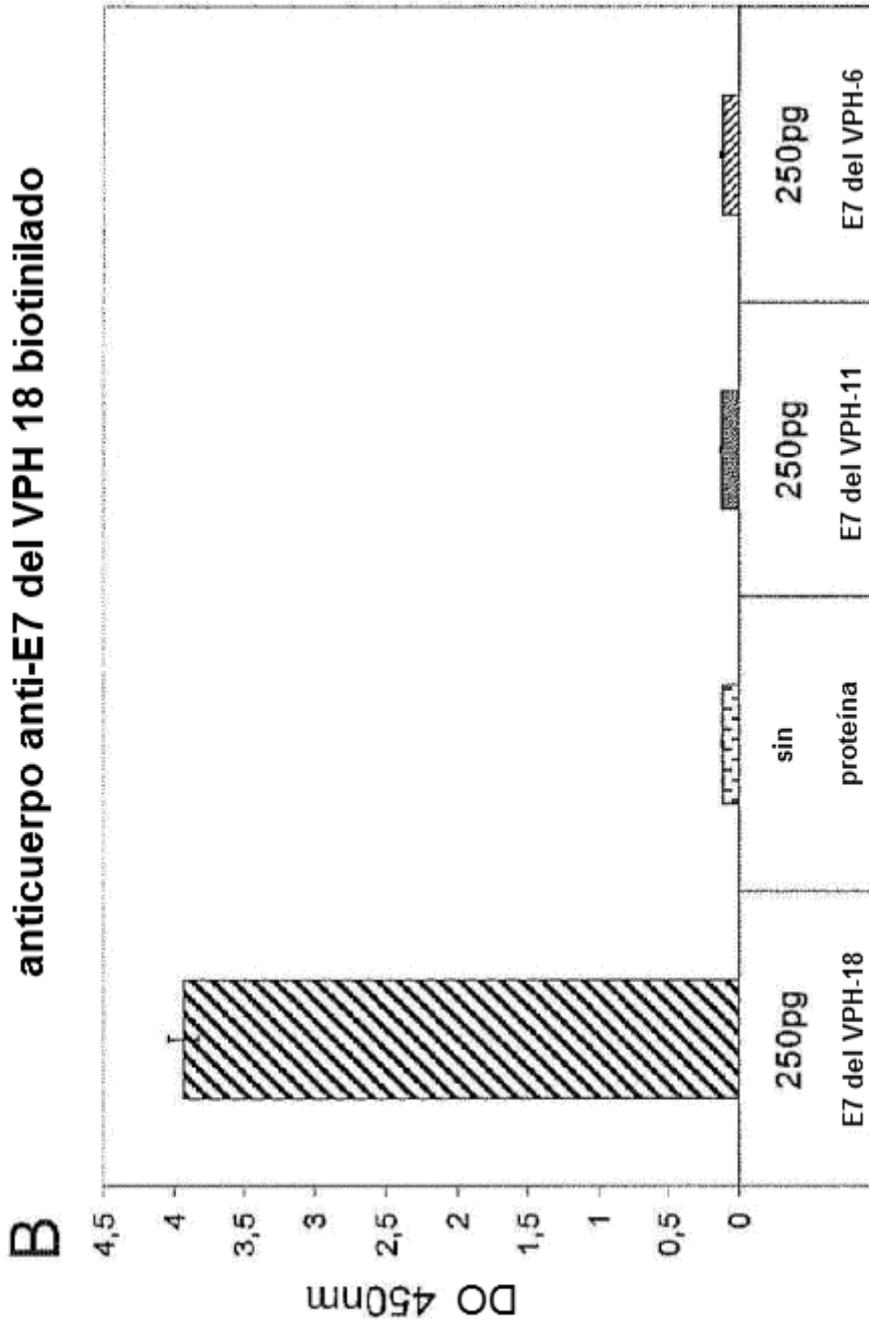


Figura 4

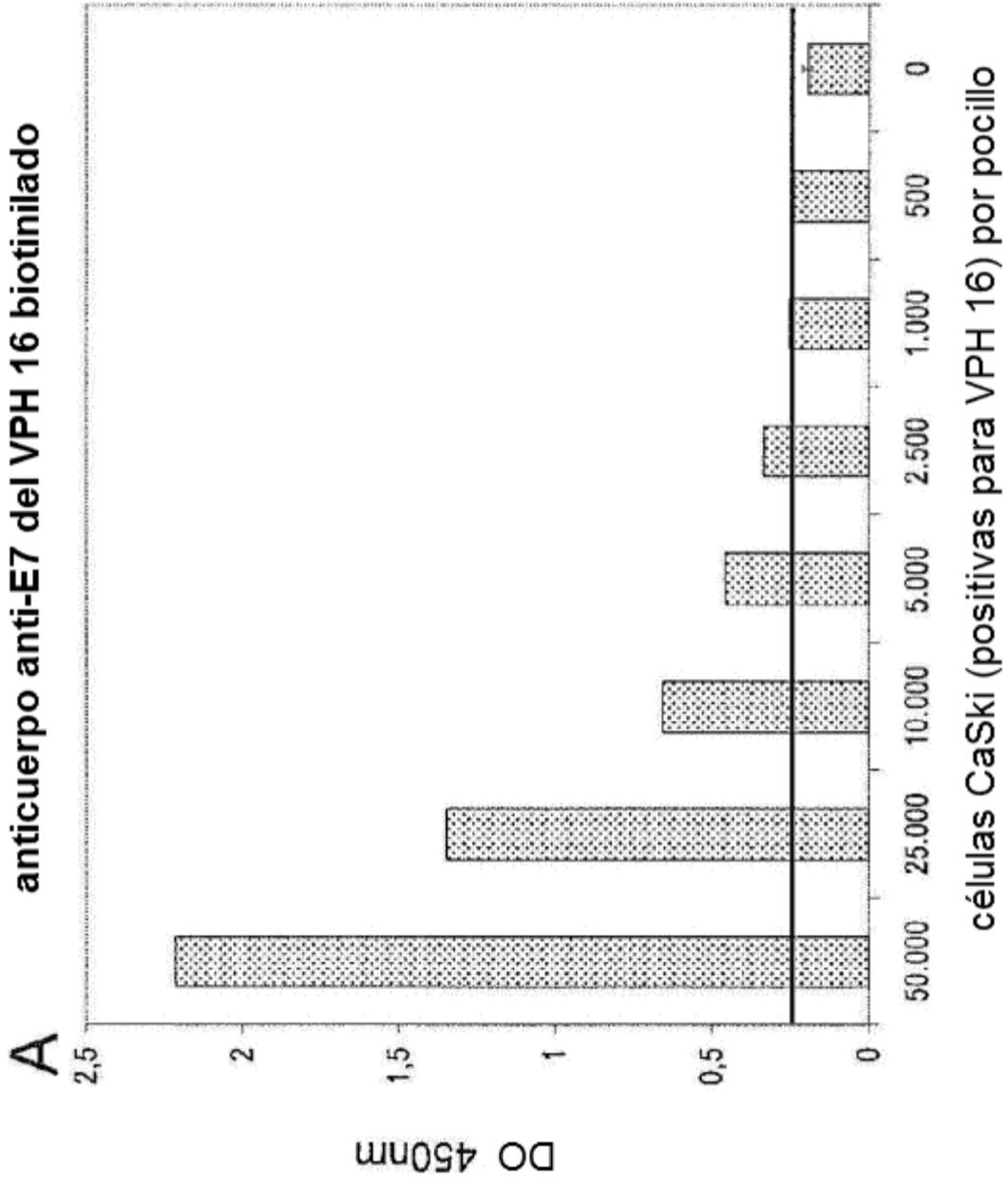


Figura 4

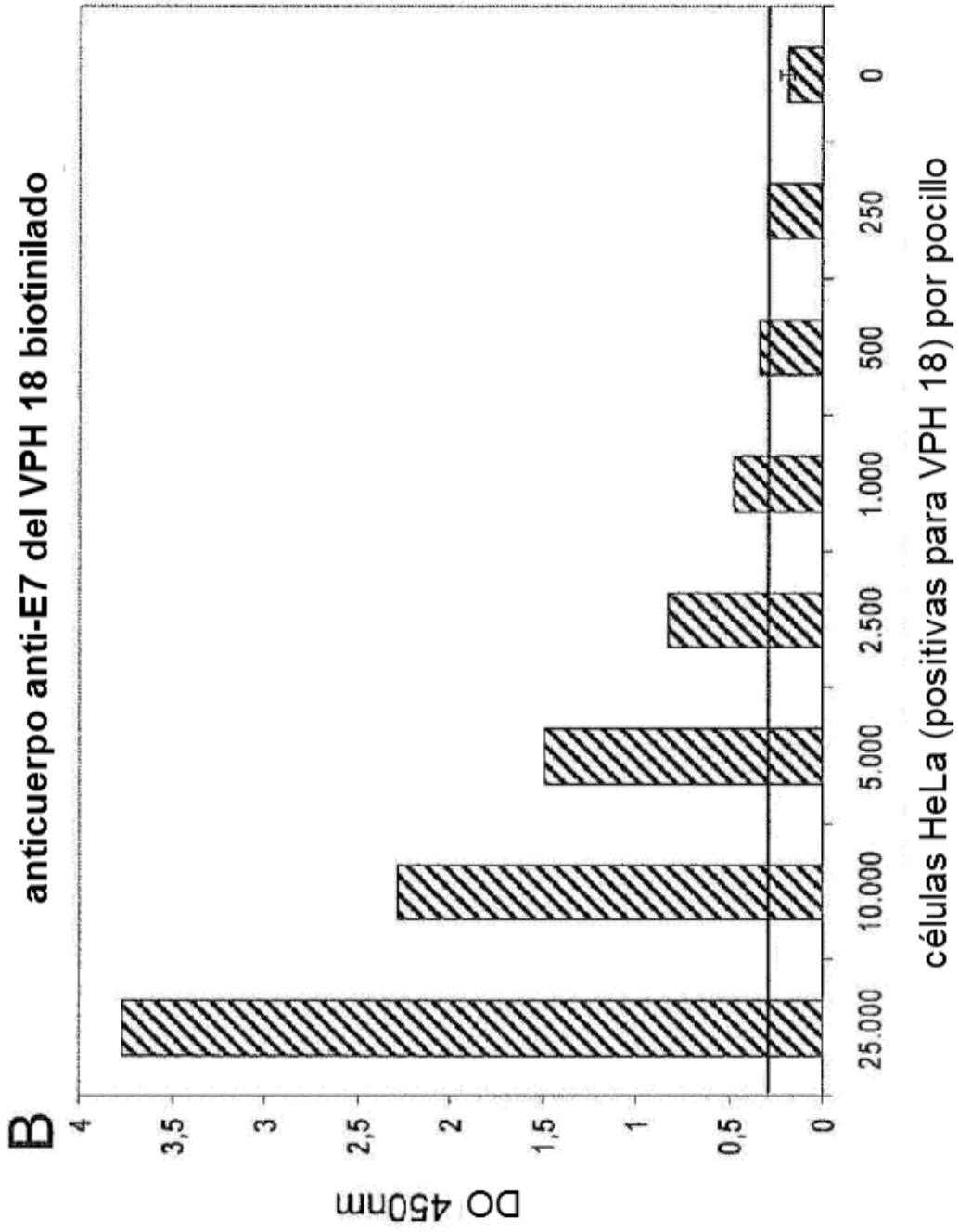


Figura 5

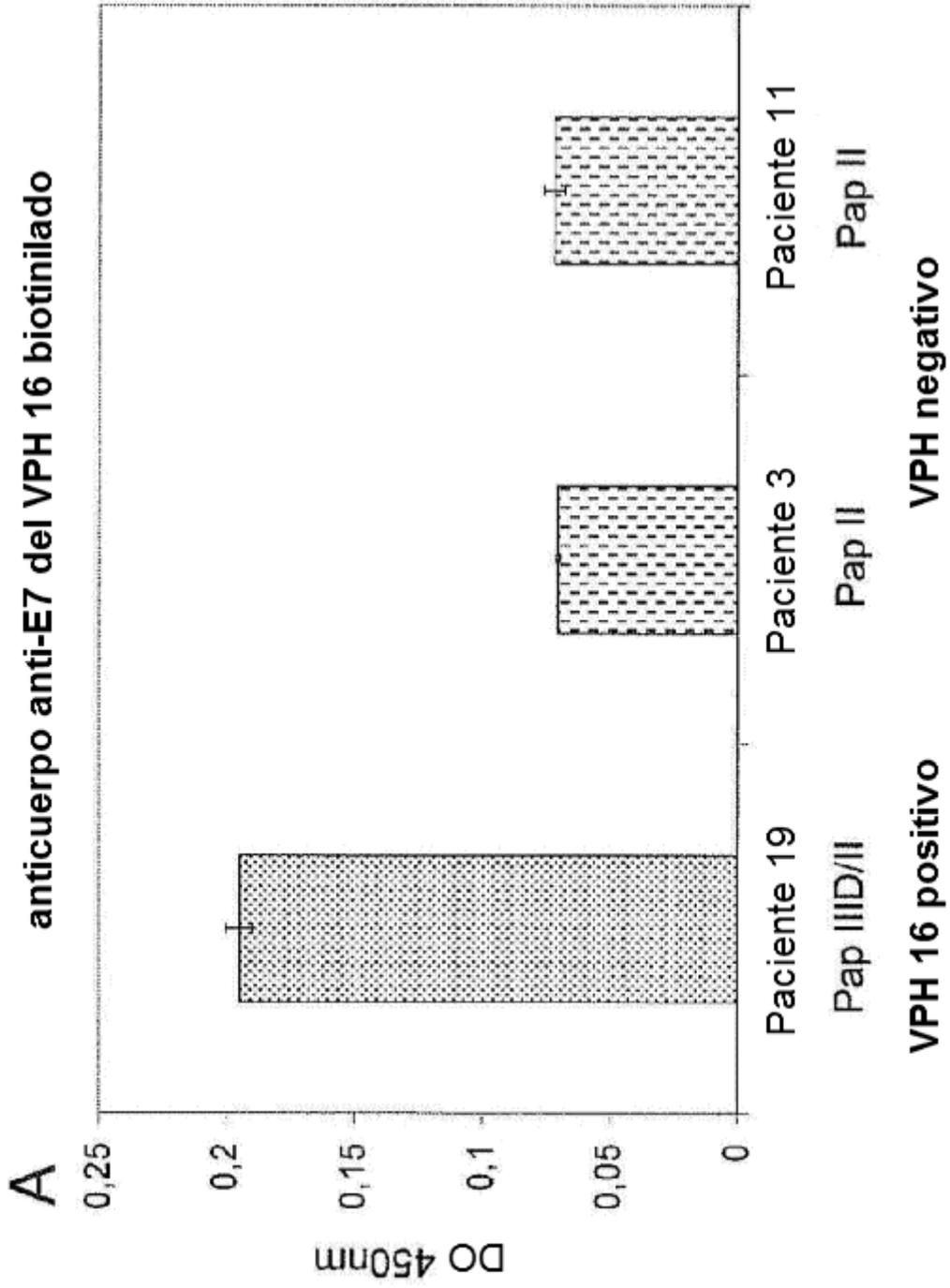


Figura 5

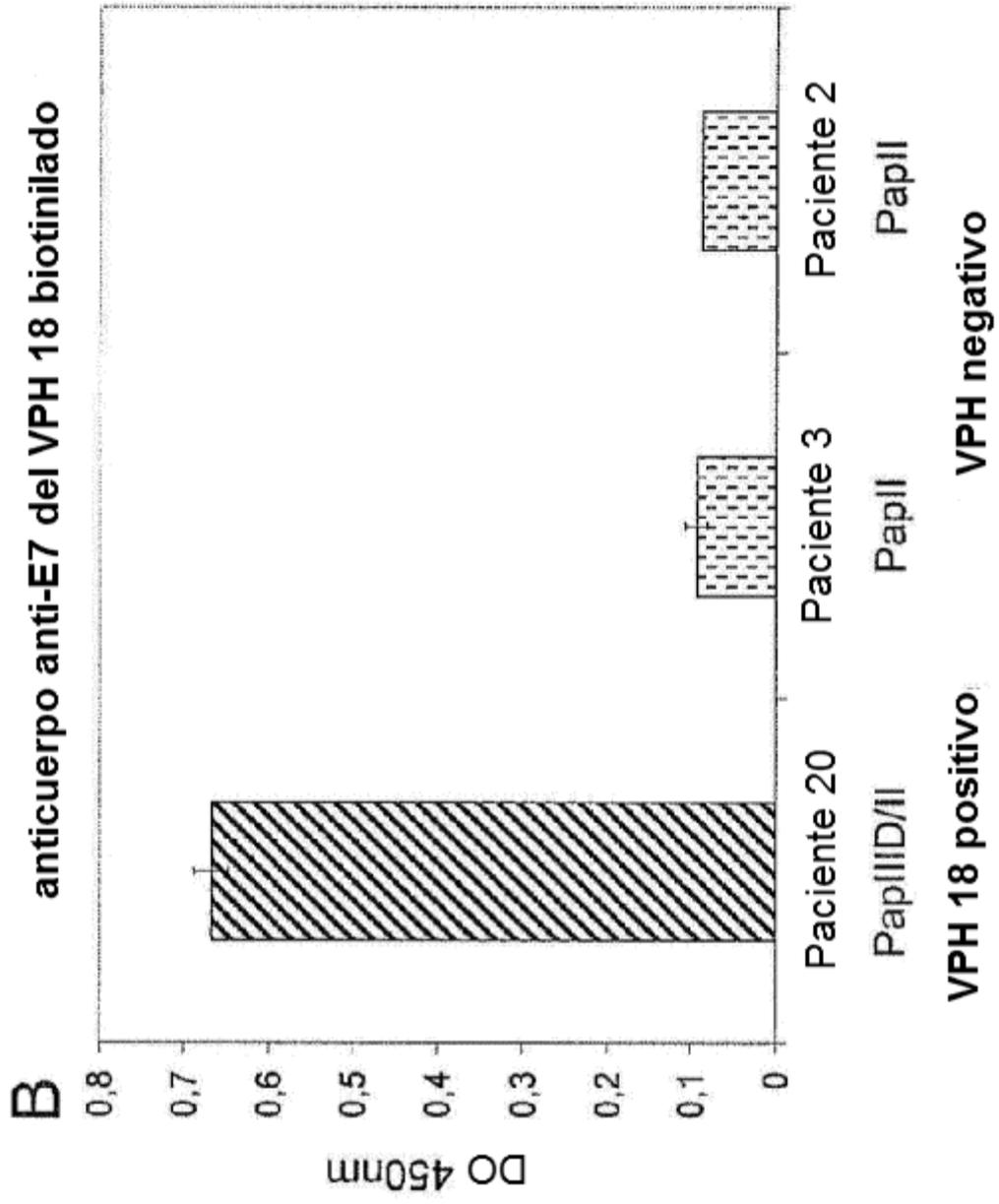
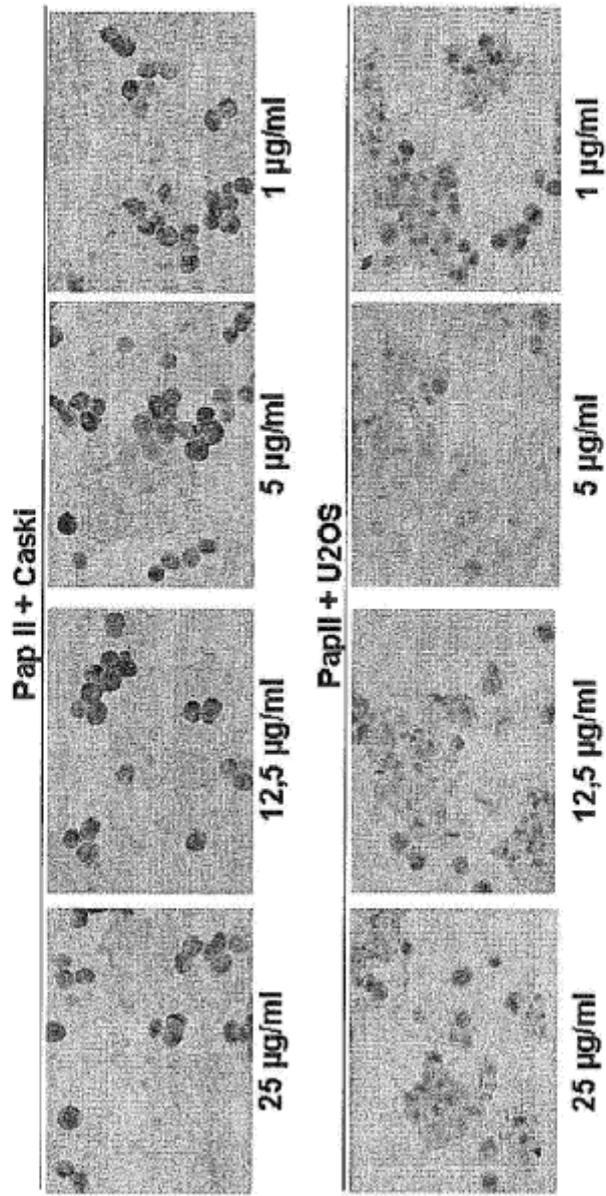


Figura 6



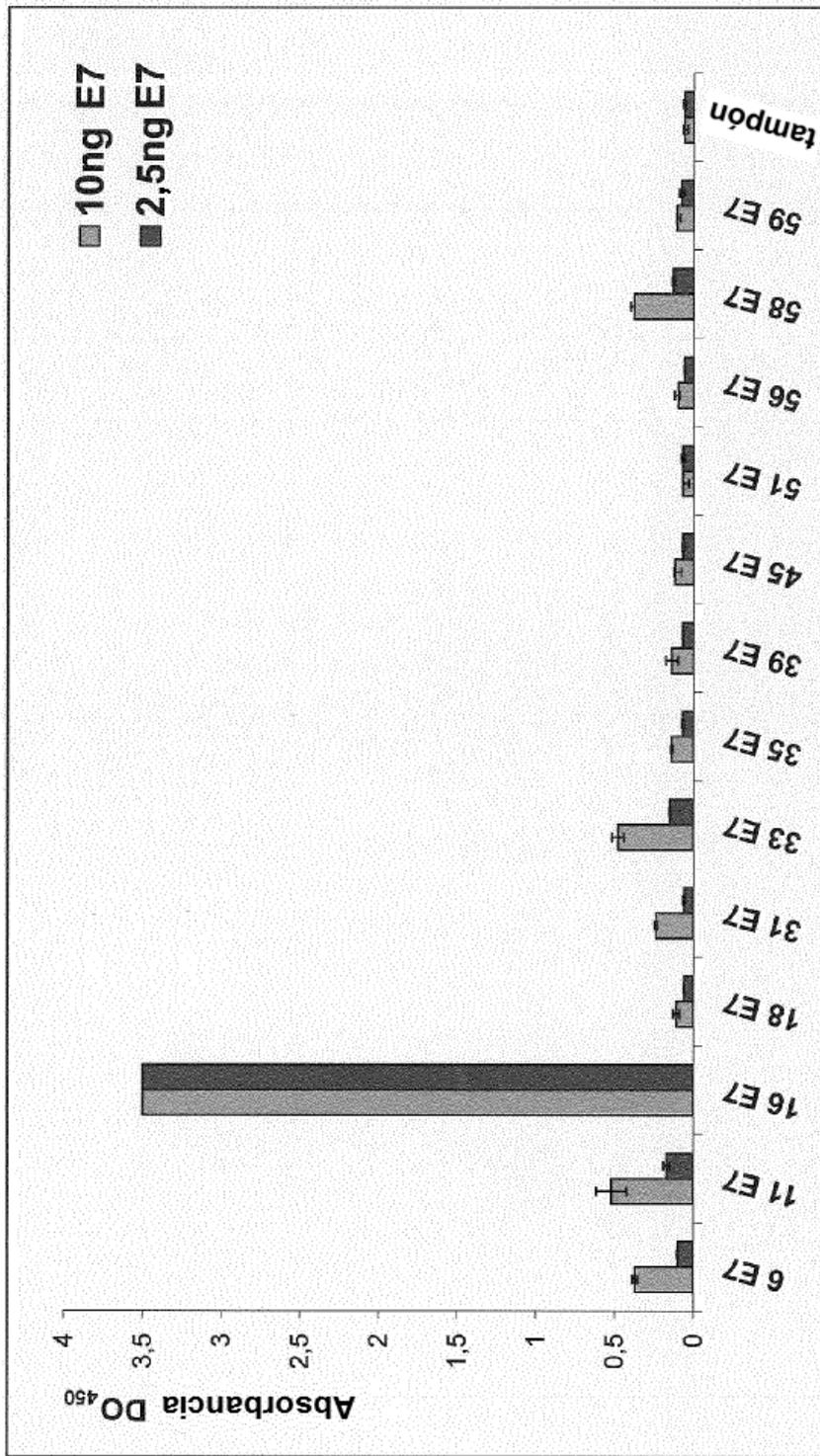


Figura 7

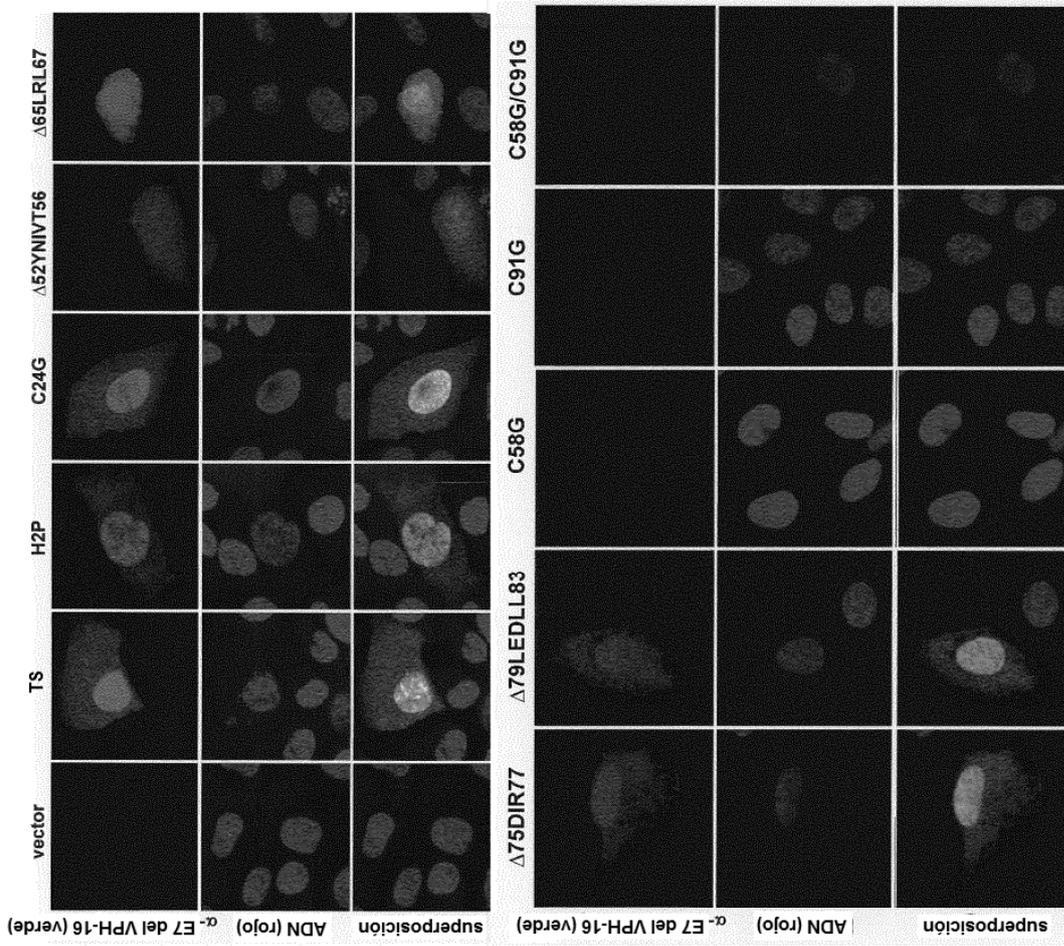
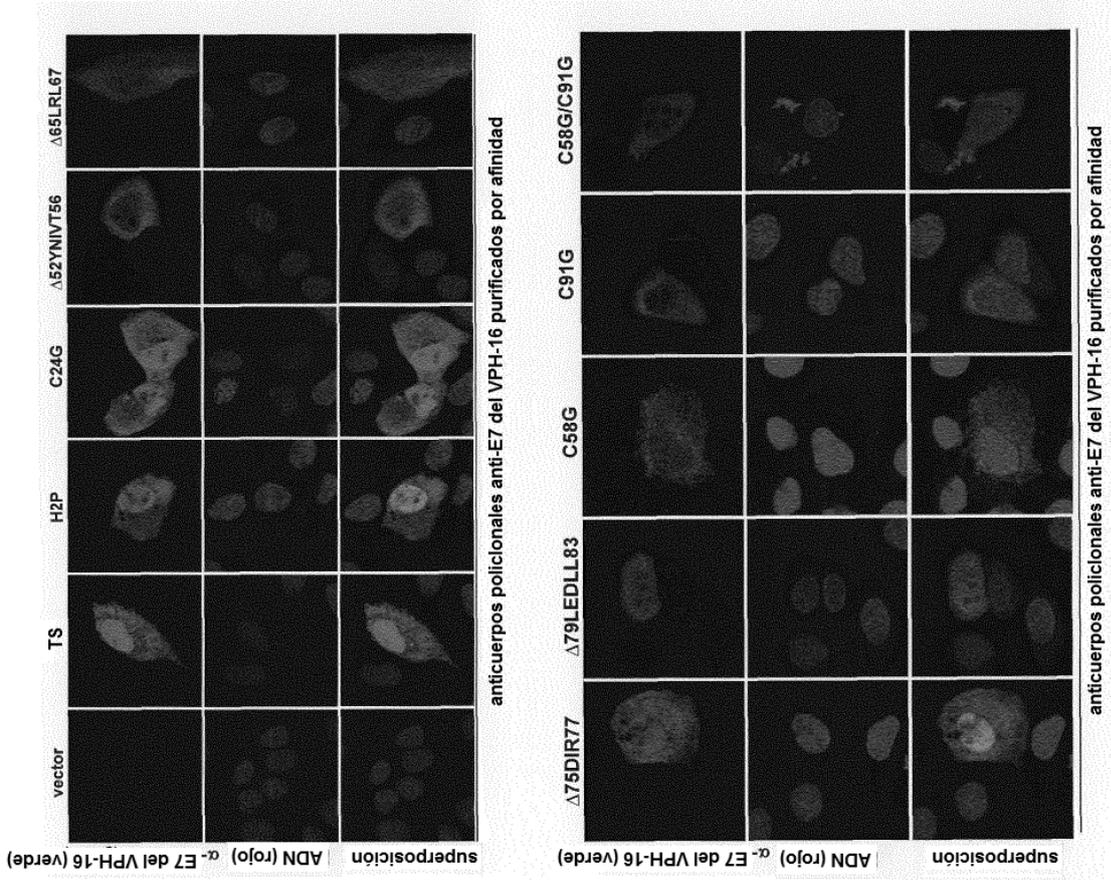


Figura 8 A

Figura 8 B



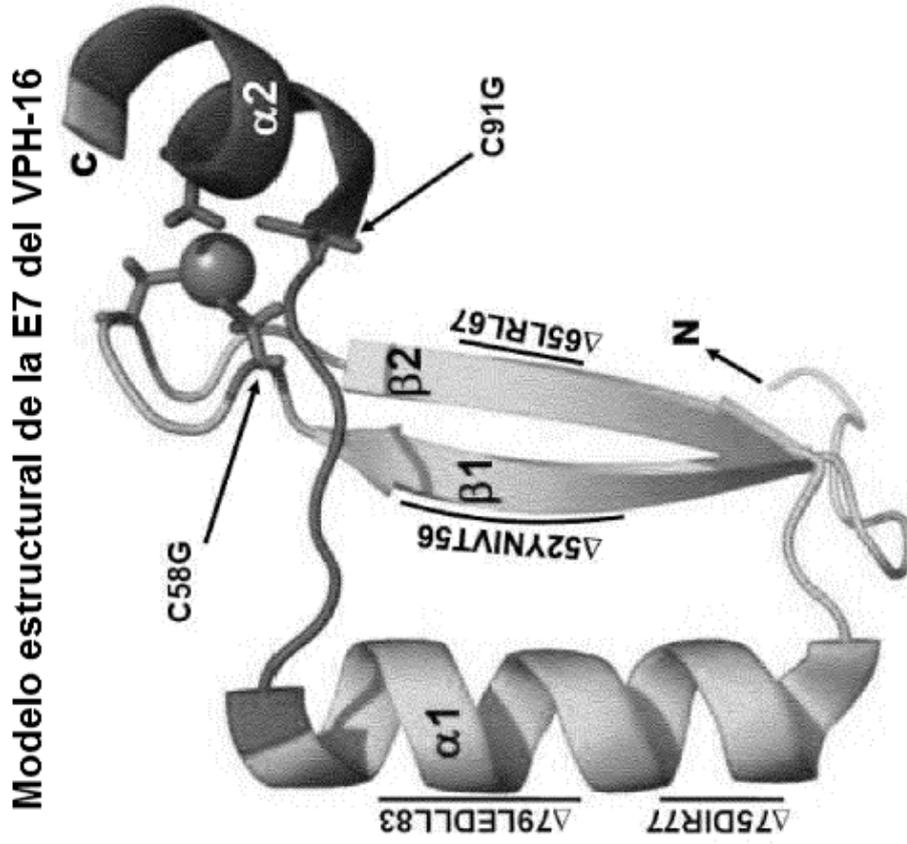


Figura 9

Figura 10

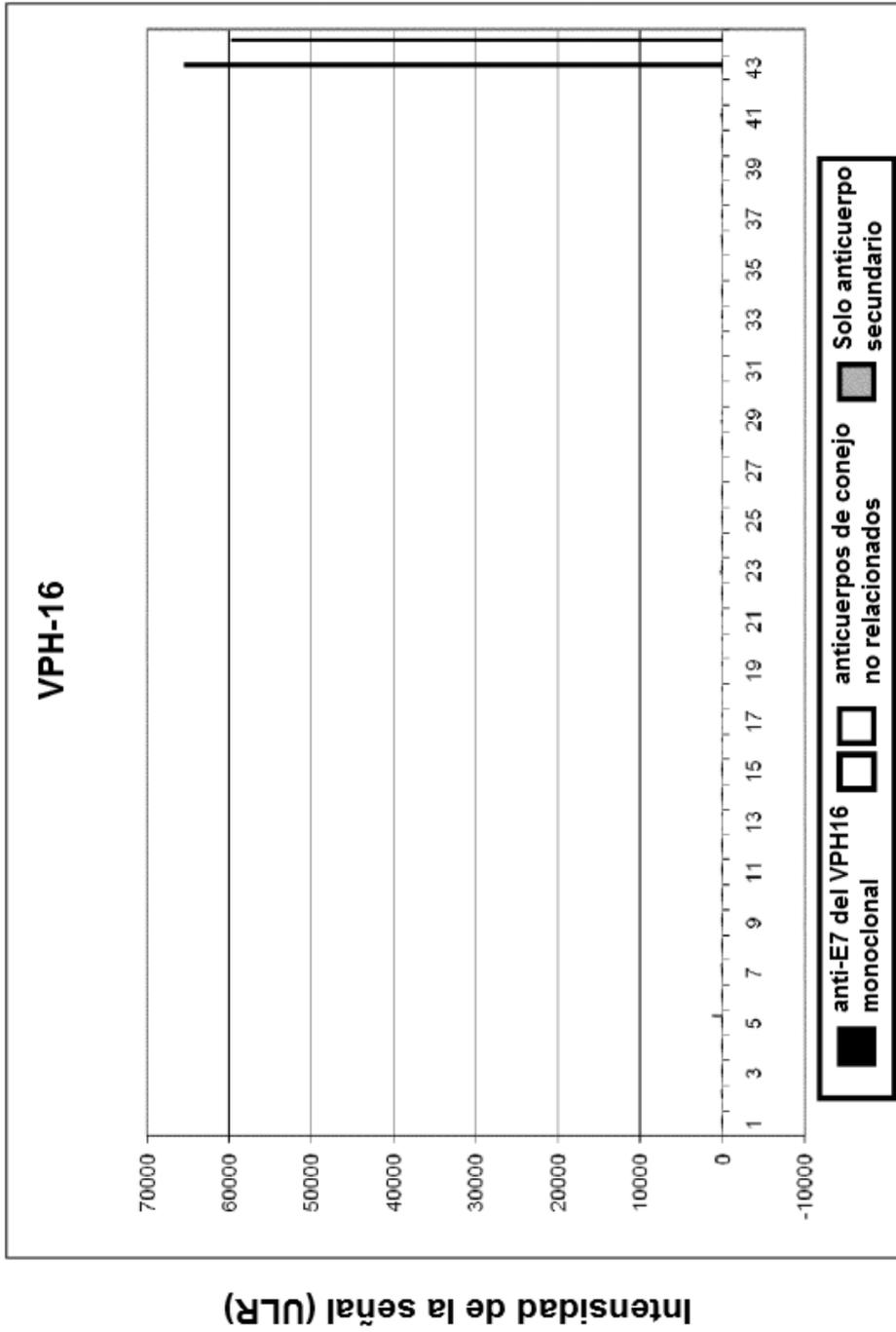
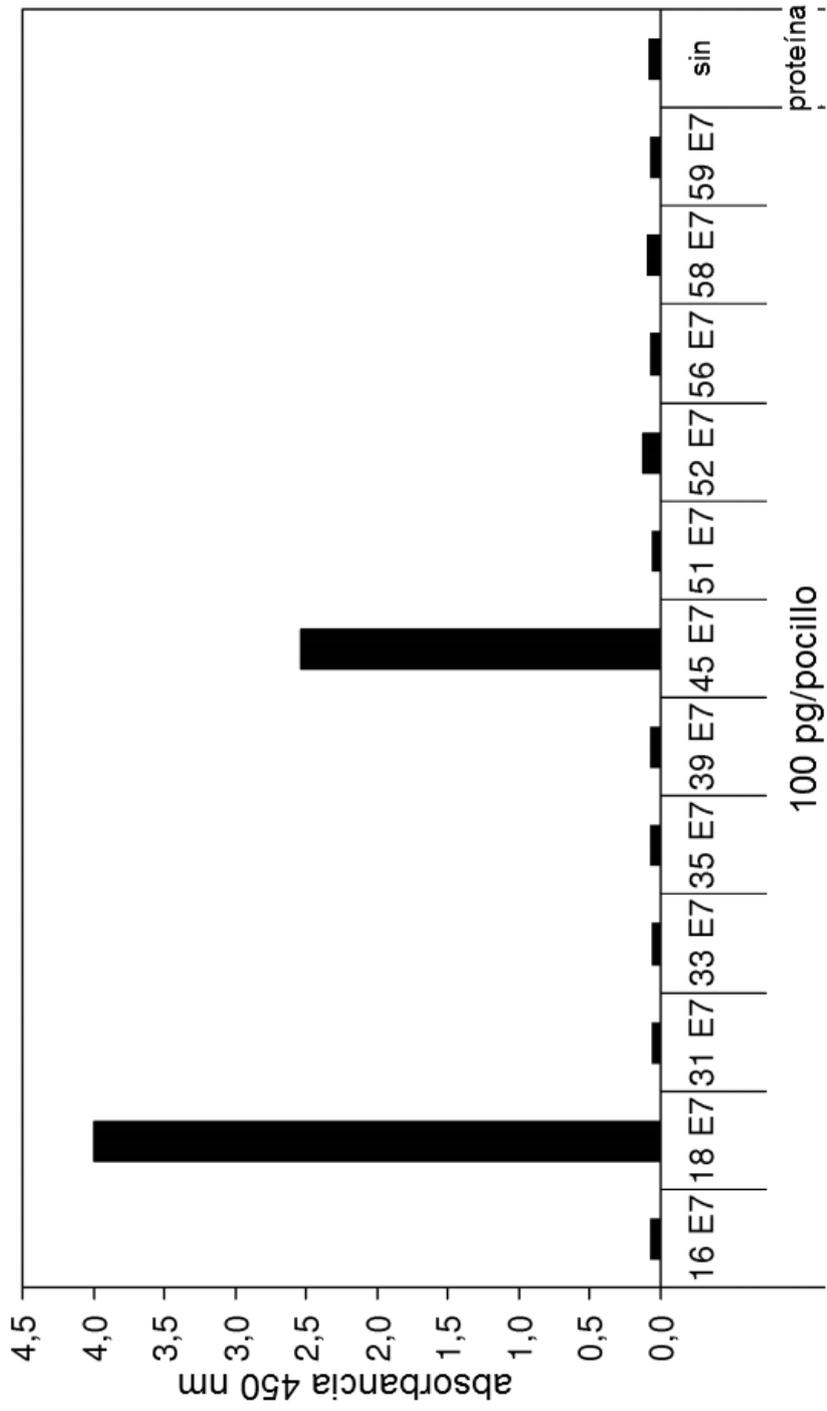


Figura 11



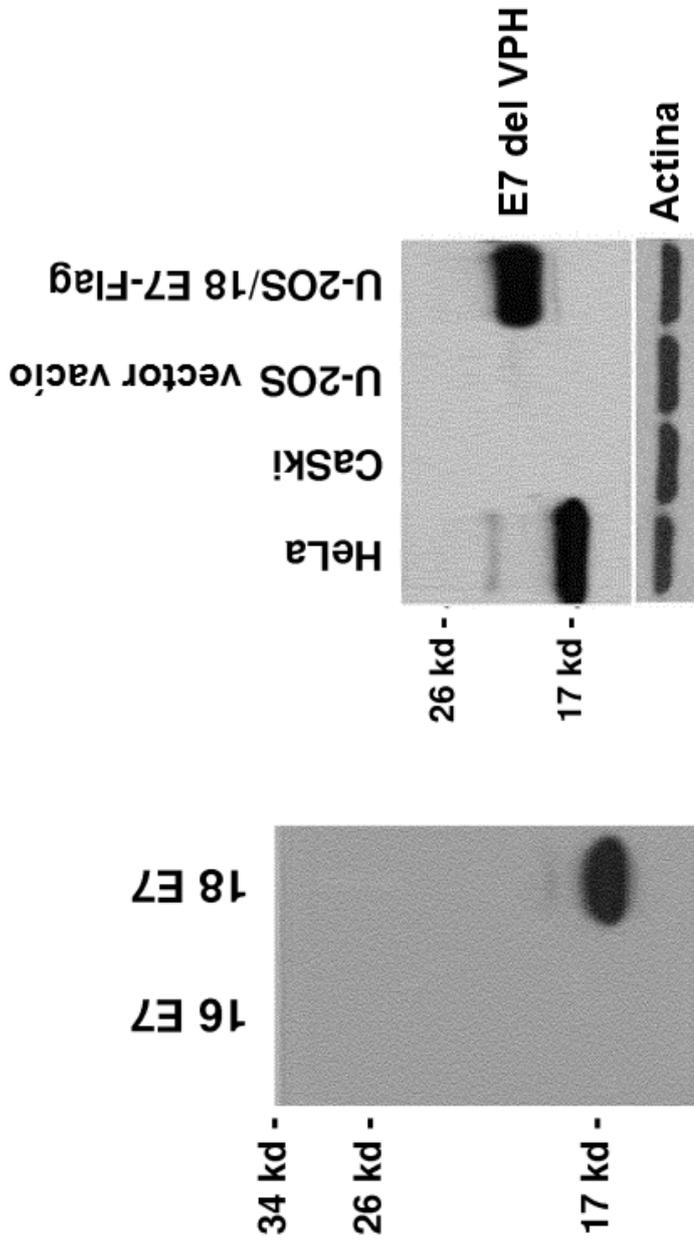


Figura 12

Figura 13

