



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 709**

51 Int. Cl.:

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07075928 .7**

96 Fecha de presentación : **04.11.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1881064**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2008**

54

Título: **Anticuerpo monoclonal anti-núcleo de VHC.**

30

Prioridad: **05.11.2001 US 337453 P**
10.10.2002 US 268561

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2010

73

Titular/es: **ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS, Inc.**
100 Indigo Creek Drive
Rochester, New York 14626, US

72

Inventor/es: **Bahl, Chander**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 339 709 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal anti-núcleo de VHC.

5 Antecedentes de la invención

Aproximadamente 170 millones de personas en todo el mundo se han infectado por el virus de la hepatitis C (VHC). En los próximos años, el número de muertes en los EE.UU. por cáncer y enfermedad hepática producida por el VHC puede superar las muertes producidas por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

10 La transmisión del VHC parece requerir un contacto sanguíneo. Portando una única hebra de ácido ribonucleico (ARN), el VHC sólo contiene un gen, que codifica un poliproteína que se rompe posteriormente dando al menos 10 proteínas funcionales. Claramente, la capacidad para someter a prueba el aporte de sangre para detectar VHC es de gran importancia. Un ensayo sensible que puede detectar la infección en una fase temprana. Por tanto sería ventajosa la detección tanto de anticuerpos como de antígenos de VHC en un único ensayo.

15 Los ensayos de detección del núcleo de VHC capturan el antígeno de VHC de las muestras infectadas por VHC sobre una fase sólida revestida con anticuerpos monoclonales anti-núcleo. La proteína del núcleo capturada se detecta mediante una reacción de unión con un anticuerpo monoclonal anti-núcleo marcado con una enzima usando tecnología de inmunoensayo convencional. La disponibilidad de buenos anticuerpos monoclonales frente a múltiples epítomos de antígeno del núcleo de VHC aumentará la sensibilidad de los ensayos de detección del antígeno de VHC. En primer lugar, múltiples anticuerpos aumentan la eficacia de la captura del antígeno de VHC de las muestras sobre la fase sólida. En segundo lugar, el uso de múltiples anticuerpos para la detección aumenta la sensibilidad del sistema proporcionando una señal acumulativa superior. Otra ventaja es que el uso de anticuerpos que reconocen múltiples epítomos en los ensayos permite a los ensayos detectar muestras infectadas con diferentes genotipos del virus VCH.

Sumario de la invención

20 La presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal dirigido contra una región de la proteína del núcleo de VHC.

25 El epítipo reconocido por este anticuerpo monoclonal tiene 15 aminoácidos ("aa") de longitud. Este anticuerpo es útil para detectar la proteína del núcleo de VHC en pacientes infectados por VHC. Específicamente, este anticuerpo es ventajoso para detectar el VHC en la sangre de seres humanos infectados. Finalmente, este anticuerpo junto con proteínas recombinantes confeccionadas de manera apropiada puede usarse para la detección simultánea de la proteína del núcleo de VHC y anticuerpos anti-VHC.

30 Los inventores presentes han desarrollado varios anticuerpos monoclonales anti-núcleo de VHC. Estos anticuerpos tienen propiedades únicas porque reconocen secuencias cortas, en la región del núcleo de VHC que no tiene epítomos principales reconocidos por los anticuerpos humanos anti-VHC. Estos anticuerpos pueden ser reactivos útiles para detectar antígeno del núcleo de VHC en muestras de sangre de individuos infectados con el VHC. El reconocimiento de epítomos cortos por estos anticuerpos monoclonales y la ubicación de estas secuencias en la región del núcleo de VHC hace a estos anticuerpos monoclonales muy útiles para el desarrollo de un ensayo de combinación antígeno/anticuerpo de VHC. Para el ensayo de combinación se usan estos anticuerpos monoclonales en combinación con el antígeno del núcleo que se ha modificado para eliminar la capacidad de estos antígenos para unirse a estos anticuerpos monoclonales pero que conservan su capacidad para unirse a anticuerpos humanos anti-VHC. Por tanto, las proteínas del núcleo de VHC usadas para capturar los anticuerpos presentes en el suero infectado no reaccionarán con los anticuerpos monoclonales frente al núcleo de VHC utilizados en la prueba para capturar simultáneamente los antígenos presentes en el suero infectado. Un ensayo de combinación puede detectar una infección por VHC antes que el ensayo de anticuerpos frente a VHC empleado actualmente.

Descripción detallada de la invención

35 La eficacia y las ventajas de la invención se ilustran de manera adicional mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1**60 Inmunógenos**

Los inmunógenos utilizados para producir los anticuerpos fueron una proteína recombinante del núcleo de longitud completa ("FLC") (aminoácidos (aa) 1-191); proteína del núcleo de VHC, c22-3, expresada en levadura como un proteína de fusión SOD (aa 1-120); y péptidos sintéticos grandes, tales como ODS243 (aa 70-110); y péptidos de 15 unidades monoméricas conjugados con hemocianina de lapa californiana (KLH) que contienen secuencias de antígeno del núcleo de VHC.

ES 2 339 709 T3

Ejemplo 2

Protocolo de inmunización

5 Se generaron los anticuerpos usando procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Ed Harlow y David Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 1988, Cold Spring Harbor, Capítulo 6. Se inmunizaron ratones con los inmunógenos descritos en el presente documento. Se extrajo la sangre de los ratones y se examinó con varias proteínas recombinantes y péptidos de la secuencia del núcleo de VHC. Se prepararon anticuerpos monoclonales puros mediante cromatografía de afinidad por proteína A. Se determinó la especificidad precisa de los anticuerpos monoclonales
10 uniendo los octapéptidos solapantes contenidos en cada uno de los correspondientes péptidos de 15 unidades monoméricas. Se mapearon la mayor parte de los anticuerpos en una región de 6-8 aminoácidos en la secuencia de proteína del núcleo de VHC.

15 Ejemplo 3

Caracterización de los anticuerpos

Se caracterizaron los anticuerpos monoclonales mediante ELISA usando péptidos sintéticos solapantes de aproximadamente 15 aa de longitud. Los anticuerpos se caracterizaron adicionalmente para determinar su especificidad
20 precisa mediante ELISA peptídico usando octapéptidos solapantes incluidos en el péptido reactivo de 15 unidades monoméricas. En la tabla siguiente se incluye un resumen de los anticuerpos generados.

25

TABLA 1

La tabla dada a continuación identifica 15 anticuerpos novedosos. Se examinaron los anticuerpos en cada fase de desarrollo del anticuerpo con placas de microtitulación de pocillos recubiertas con inmunógeno. El inmunógeno
30 utilizado para inmunizar los ratones que producían cada cepa de anticuerpo monoclonal se identifica como uno de los siguientes: péptido ODS 243, un péptido grande definido adicionalmente en el ejemplo 1; "FLC" significa antígeno del núcleo de longitud completa, definido en el ejemplo 1; o péptido n° 8 del núcleo conjugado con KLH, un péptido corto, definido adicionalmente en el presente documento. Se muestra la especificidad de cada uno para un péptido enumerado y se identifican en el presente documento las secuencias de aminoácidos de cada péptido enumerado. Además, en la
35 última columna está incluido el epítipo al que se une específicamente el anticuerpo, definido por los aminoácidos que codifican el epítipo.

40

Nº ATC C	FUSIÓN Nº AG, Clon	INMUNÓGEN O	ISOTIP O	ESPECIFICIDAD	AA
45 PTA- 3811	ODS243, 7B4F11	Péptido ODS 243	IgG2b	Péptido n° 8 del núcleo de VHC	77-91
50 PTA- 3803	ODS243, 1E3D12	Péptido ODS 243	IgG2a	Péptido n° 9 del núcleo de VHC	86-100

55

60

65

ES 2 339 709 T3

5	PTA-3802	ODS243, 7C12C4	Péptido ODS 243	IgG2b	Péptido nº 8 del núcleo de VHC	77-91
	PTA-3813	núcleo nº 3, 2A11C6	FLC	IgG1	Péptido nº 11 del núcleo de VHC	106-120
10	PTA-3809	núcleo nº 12, 1B7A1	FLC	IgG1	Péptido nº 3 del núcleo de VHC	29-43
	PTA-3805	núcleo nº 13, 5A12G12	FLC	IgG1	Péptido nº 4 del núcleo de VHC	39-53
15	PTA-3812	núcleo nº 13, 4H7E7	FLC	IgG1	Péptido nº 5 del núcleo de VHC	48-62
	PTA-3806	núcleo nº 13, 12F4A11	FLC	IgG1	Péptido nº 6 del núcleo de VHC	58-72
20	PTA-3804	núcleo nº 13, 14D12A12	FLC	IgG1	Péptido nº 7 del núcleo de VHC	67-81
	PTA-3807	c22-8 nº 4, 6D8E8	Péptido nº 8 del núcleo conjugado con KLH	IgG1	Péptido nº 8 del núcleo de VHC	77-91
25	PTA-3800	núcleo nº 12, 4G10G6	FLC	IgG2b	Péptido nº 10 del núcleo de VHC	96-110
	PTA-3801	núcleo nº 13, 6E7E1	FLC	IgG2a	Péptido nº 11 del núcleo de VHC	106-120
30	PTA-3810	núcleo nº 13, 11D12A6	FLC	IgG2b	Péptido nº 11 del núcleo de VHC	106-120
	PTA-3808	núcleo nº 13, 14B7C3	FLC	IgG3	Péptido nº 11 del núcleo de VHC	106-120
35	PTA-3799	núcleo nº 12, 4A6H3	FLC	IgG1	Péptido nº 16 del núcleo de VHC	156-170
40						
45						
50						

TABLA 2

La tabla a continuación muestra péptidos sintéticos del núcleo de VHC.

Nº ID del péptido	Secuencia de aminoácidos	Ubicación de AA de proteína de VHC	SEC ID NO.:
0	MSTNPKPQKKNKRNT	1-15	1
1	KNKRNTNRRPQDVKF	10-24	2

ES 2 339 709 T3

2	QDVKFPGGGQIVGGV	20-34	SEC ID NO.: 3
3	QIVGGVYLLPRRCPR	29-43	SEC ID NO.: 4
5	4 RRGPRLGVRATRKTS	39-53	SEC ID NO.: 5
5	5 ATRKTSERSQPRGRR	48-62	SEC ID NO.: 6
6	6 PRGRRQPIPKARRPE	58-72	SEC ID NO.: 7
10	7 KARRPEGRTWAQPGY	67-81	SEC ID NO.: 8
8	8 AQP GYPWPLYGNEGC	77-91	SEC ID NO.: 9
9	9 YGNEGCGWAGWLLSP	86-100	SEC ID NO.: 10
15	10 WLLSPRGSRPSWGPT	96-110	SEC ID NO.: 11
11	11 SWGPTDPRRRSRLNG	106-120	SEC ID NO.: 12
12	12 SRLNGKVIDTLTCGF	116-130	SEC ID NO.: 13
20	13 LTCGFADLMGYIPLV	126-140	SEC ID NO.: 14
14	14 YIPLVGAPLGAARA	136-150	SEC ID NO.: 15
15	15 GAARALAHGVRVLED	146-160	SEC ID NO.: 16
25	16 RVLEDGVNYATGNLP	156-170	SEC ID NO.: 17
17	17 TGNLPOCSFSIFLLA	166-180	SEC ID NO.: 18
30	18 IFLALLSCLTVPAS	176-190	SEC ID NO.: 19

TABLA 3

La tabla a continuación muestra el rastreo del anticuerpo identificado como PTA-3811 con placas de ELISA revestidas con péptidos del núcleo de VHC.

Nº ID del péptido	Densidad óptica en ELISA
0	0
1	0,04
2	0
3	0,01
4	0,01
5	0
6	0
7	0,01
8	2,5
9	0
10	0,01

ES 2 339 709 T3

11	0,01
12	0
13	0,01
14	0,01
15	0
16	0,01
17	0,01
18	0,01

TABLA 4

Mapeo de epítomos del anticuerpo monoclonal PTA-3811 usando octapéptidos solapantes.

Secuencia de octapéptidos	Ubicación de AA	ALU
(7.9) Biotina-Ahx-TWAQPGYP	75-82	0,57
(7.10) Biotina-Ahx-WAQPGYPW	76-83	1,05
(8.1) Biotina-Ahx-AQPGYPWP	77-84	0,61
(8.2) Biotina-Ahx-QPGYPWPL	78-85	10,84
(8.3) Biotina-Ahx-PGYPWPLY	79-86	45,89
(8.4) Biotina-Ahx-GYPWPLYG	80-87	43,03
(8.5) Biotina-Ahx-YPWPLYGN	81-88	33,81
(8.6) Biotina-Ahx-PWPLYGNE	82-89	3,11
(8.7) Biotina-Ahx-WPLYGNEG	83-90	0,27
(8.8) Biotina-Ahx-PLYGNEGCG	84-91	0,3
(8.9) Biotina-Ahx-LYGNEGCG	85-92	0,42
(9.1) Biotina-Ahx-YGNEGCGW	86-93	0,49
(9.2) Biotina-Ahx-GNEGCGWA	87-94	0,6

El anticuerpo monoclonal 7B4F11 reaccionó con los octapéptidos 8.2, 8.3, 8.4, 8.5 en un ELISA de quimioluminiscencia medido en unidades luminosas arbitrarias (ALU). Basándose en la reactividad de los octapéptidos, el epítomo monoclonal está centrado alrededor de la secuencia PWPL.

Los ejemplos anteriores se desean para ilustrar, pero no para limitar, el alcance y el espíritu de la presente invención.

Se debería entender por alguien experto en la técnica que todos los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento se pueden usar individualmente o como combinaciones de agentes de captura o como reactivos de detección para la detección del antígeno de núcleo de VHC en un ensayo de antígeno de núcleo de VHC o en un ensayo de combinación de antígeno/anticuerpo de VHC.

ES 2 339 709 T3

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular de hibridoma correspondiente al número de la ATCC, PTA-3806.
2. Un anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma según la reivindicación 1.
3. El uso del anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2 para detectar antígeno del núcleo de VHC.
4. Kits de ensayo que contienen el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 339 709 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.
5 <120> Anticuerpos monoclonales anti-núcleo de VHC
<130> P032220EP
<140> 02257622.7
<141> 04-11-2002
10 <150> US 60/337453
<151> 05-11-2001
<160> 19
<170> PatentIn versión 3.1
15
<210> 1
<211> 15
<212> PRT
20 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 1
25
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Lys Lys Asn Lys Arg Asn Thr
1 5 10 15

<210> 2
30 <211> 15
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C
35
<400> 2

Lys Asn Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe
40 1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
45 <212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 3
50
Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val
1 5 10 15

55 <210> 4
<211> 15
<212> PRT
60 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 4

65 Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg
1 5 10 15

ES 2 339 709 T3

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Virus de la hepatitis C

 <400> 5

 10 Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser
 1 5 10 15

 <210> 6
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

 20 <400> 6

 Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg
 1 5 10 15
 25
 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Virus de la hepatitis C

 <400> 7

 35 Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu
 1 5 10 15

 <210> 8
 40 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

 45 <400> 8

 Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr
 1 5 10 15
 50
 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 55 <213> Virus de la hepatitis C

 <400> 9

 60 Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys
 1 5 10 15

 65 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 339 709 T3

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 10

5 Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro
1 5 10 15

10 <210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

15 <400> 11

20 Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr
1 5 10 15

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

25 <400> 12

30 Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg Leu Asn Gly
1 5 10 15

35 <210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

40 <400> 13

45 Ser Arg Leu Asn Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

50 <400> 14

55 Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val
1 5 10 15

60 <210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

65

ES 2 339 709 T3

<400> 15

5 Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala
1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 16

15 Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
1 5 10 15

20 <210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

25

<400> 17

30 Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro
1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

35 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 18

40 Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala
1 5 10 15

45 <210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

50

<400> 19

55 Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser
1 5 10 15

60

65