



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ N.º de publicación: **ES 2 088 820**

⑫ Número de solicitud: 9400265

⑬ Int. Cl.⁶: C07K 16/12

C12N 5/18

A61K 39/395

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **14.02.94**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.96**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.09.96

⑱ Solicitante/s: **Universidad de Oviedo,**
representada por el Vicerrector de Investigación,
D. Lorenzo Pueyo Casaus
San Francisco, 3
33003 Oviedo, ES

⑲ Inventor/es: **de los Toyos González, Juan Ramón;**
Méndez García, Francisco. J.;
Vázquez Valdés, Fernando;
Fernández Aparicio, Jesús;
Fleites Gutiérrez, Ana y
Hardisson Rumeu, Carlos

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Anticuerpos monoclonales antineumolisina.**

㉒ Resumen:

Anticuerpos monoclonales antineumolisina.

Se suministran hibridomas estables monoclonales específicos para la neumolisina que:

1) Reconocen epítopos distintos en la molécula de neumolisina; y

2) Neutralizan su acción hemolítica in vitro.

Estos anticuerpos, fragmentos derivados de ellos o formas modificadas de todos ellos, tienen aplicaciones diversas, incluyendo las diagnósticas, profilácticas y/o terapéuticas.

ES 2 088 820 A1

DESCRIPCION

Anticuerpos monoclonales antineumolisina.

La presente invención se refiere a la generación de hibridomas y a la producción y caracterización de los correspondientes anticuerpos monoclonales específicos para la neumolisina, los cuales podrían ser utilizados con distintos fines, incluyendo los diagnósticos, profilácticos y terapéuticos.

Estado de la técnica

Durante mucho tiempo la cápsula del neumococo (*Streptococcus pneumoniae*) ha sido considerada como su principal y más determinante factor de virulencia. No obstante, las investigaciones desarrolladas en años más recientes han puesto de manifiesto que ciertas proteínas neumocócicas también pueden jugar un papel decisivo en la patogénesis. De entre ellas, hay que destacar la neumolisina.

La neumolisina es una cadena polipeptídica de 53 -kDa, producida por la práctica totalidad de los aislamientos clínicos de neumococo. Es un miembro de una familia de toxinas relacionadas, con propiedades citolíticas -en particular, hemolíticas-, sintetizadas por cuatro géneros distintos de bacterias Gram-positivas. El gen que codifica para la neumolisina ha sido clonado y secuenciado, y la toxina es expresada ahora en su forma recombinante. La mayor homología de secuencia aminoacídica y semejanza inmunológica la presente con la estreptolisina O, producida por *S.pyogenes*.

La primera evidencia directa de la implicación de la neumolisina en la patogénesis fué la observación de que la inmunización experimental con la toxina altamente purificada incrementó el tiempo de supervivencia de ratones infectados con neumococos virulentos.

Su papel patogénico se apoya también en otros dos tipos de evidencia. De una parte, han sido obtenidos diversos tipos de neumococos con mutaciones en el gen de la neumolisina; estos mutantes exhiben diferentes grados de virulencia. Por otra parte, la mayoría de los pacientes de neumonía neumocócica desarrollan títulos significativos de anticuerpos circulantes antineumolisina.

La vacuna antineumocócica actualmente disponible está constituida exclusivamente por polisacáridos de la cápsula, muy poco inmunogénicos y escasamente protectores. Además, la inmunización es, en todo caso, dependiente de los erotipos capsulares presentes en la vacuna. En vista de sus potenciales propiedades protectoras, mutantes atóxicos de la neumolisina -neumolisoides-, en combinación con otros componentes proteicos del neumococo, son objeto de investigación para el desarrollo de nuevas vacunas antineumocócicas. El interés de las vacunas conjugadas portador proteico-polisacárido es doble: de una parte, la conjugación de los polisacáridos a un portador proteico potencia su inmunogenicidad; de otra, los mecanismos inmunes efectores estimulados por epítomos de los portadores serían protectores por sí mismos, e independientes de los serotipos capsulares conjugados. (Paton, J.C., Andrew, P.W., Boulnois, G.J., and Mitchell, T.J. 1993. "Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: The role of pneumococcal proteins". Annu. Rev. Microbiol. 47:89-115).

Fundamento de la invención

La generación de anticuerpos monoclonales específicos para la neumolisina tiene, al menos, un triple interés:

- 1) Desde el punto de vista de la investigación básica, los anticuerpos monoclonales se perfilan como herramientas biológicas de importancia capital para profundizar en la caracterización molecular de la toxina y en sus relaciones estructura-función.
- 2) Los anticuerpos monoclonales específicos para epítomos exclusivos de la neumolisina podrían ser empleados como reactivos de diagnóstico de las infecciones neumocócicas, en ensayos tipo ELISA o de inmunoblotting, a partir de muestras biológicas de pacientes. La especificidad de diagnósticos equivocados por posible confusión con la estreptolisina O (véase patente ES-A-9302615).
- 3) La neumolisina y ciertos neumolisoides se han demostrado experimentalmente protectores a través de la inducción de anticuerpos. Por consiguiente, anticuerpos monoclonales específicos para determinados dominios funcionales de la toxina podrían ser igualmente protectores y tener, por consiguiente, potenciales aplicaciones terapéuticas, ya sea en su forma original, o fragmentos derivados, o formas modificadas de los mismos.

Según nuestro conocimiento, nuestro grupo investigador ha sido el primero en generar anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocen epítomos exclusivos de la neumolisina.

Descripción de la invención

Ratones BALB/c fueron hipedrinmunizados con neumolisina recombinante. Tras aplicar diferentes pautas de inmunización, se generaron hibridomas de esplénocitos y células de mieloma murino Sp 2/0 por técnicas convencionales.

A lo largo de todo el proceso de clonación y expansión de los hibridomas secretores, los sobrenadantes de los cultivos correspondientes fueron ensayados en ELISA indirecto frente a neumolisina recombinante.

Los hibridomas seleccionados fueron subclonados dos veces por dilución al límite. Desde la fecha de la segunda subclonación, los hibridomas se han demostrado estables en relación a todas sus características iniciales, entre las que se incluye la producción de AcM antineumolisina.

Los AcM fueron purificados mediante cromatografía de adsorción tiofílica, empleando columnas de AFFI-TTM y siguiendo las instrucciones del proveedor (KEM-EN-TEC, Copenhague, Dinamarca).

El subtipo de los AcM generados por los hibridomas subclonados fue determinado en ELISA indirecto, en placas de enzoinmunoensayo preparadas con neumolisina y mediante el empleo de un kit comercial ad hoc de Boehringer Mannheim.

Los AcM antineumolisina, designados e identificados en adelante como antiPLY-1, antiPLY-2 y antiPLY-3 fueron caracterizados parcialmente aplicando diversas técnicas. Sus propiedades se indican resumidamente en la Tabla 1.

Los ensayos ELISA y de inmunoblotting fueron realizados según procedimientos convencionales. En los ensayos ELISA, el sistema enzimático empleado fue peroxidasa de rábano; la absorbancia óptica fue medida a 492 nm (620 nm de referencia) y los sustratos empleados fueron OPD (SIGMA) y peróxido de hidrógeno. En los tests de inmunoblotting, se empleó fosfatasa alcalina, y una mezcla de BCIP y NBT (Boehringer Mannheim) como sustratos; los resultados fueron leídos a simple vista.

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Para los estudios de la capacidad neutralizante fue preparada una solución madre de neumolisina - en tampón fosfato 10mM con 1% de seroalbúmina bovina y 0,1% de azida sódica, pH final 7,3 (solución PBS-BSA-AS) conteniendo una unidad hemolítica en 25 μ l. Esta determinación previa de la actividad hemolítica de la neumolisina se hizo empleando una solución de eritrocitos de oveja al 1,6% en tampón fosfato 10mM, pH 7,4. Para la estimación de las propiedades neutralizantes, 25 μ l de diluciones seriadas 1:2 de los AcM en PBS-BSA-AS fueron depositados en los pocillos de placas de microtitulación. El primer pocillo de cada serie contuvo 1 μ g de AcM. Estos 25 μ l de solución de AcM fueron entonces mezclados con 25 μ l de la solución de neumolisina y la mezcla fue incubada a 37°C durante 30 minutos.

Al cabo de este tiempo, se añadieron a todos los pocillos 50 μ l de la solución de eritrocitos arriba mencionada, se homogeneizaron con suavidad las mezclas y se incubaron a 37°C durante otros 30 minutos. La capacidad neutralizante fue estimada como la mayor dilución de AcM que inhibió por completo la hemólisis. Estas estimaciones se hicieron también por triplicado.

Según se indica en la Tabla 1, los tres anticuerpos mencionado reaccionan con la neumolisina (PLY) en ELISA y en inmunoblotting, lo que sugiere que los tres reconocen epítomos continuos en la molécula de la toxina. En igualdad de condiciones experimentales, los tres muestran un grado comparable de reactividad en inmunoblotting, lo cual no es cierto en ensayos ELISA.

Ninguno de ellos reacciona con la estreptolisina O (SLO) en ELISA. AntiPLY-3 reconoce débilmente a esta toxina en inmunoblotting; no obstante, cuando SLO es sometida a condiciones desnaturizantes más drásticas (calentamiento a 100°C durante 30 minutos), aquella reacción es 3 +, lo que indica que este AcM reconoce un epítomo interno, no fácilmente accesible, en la molécula de SLO.

Por otra parte, los tres AcM son bloqueantes de la actividad hemolítica de la PLY, exhibiendo igualmente diferente capacidad.

La afinidad relativa de estos AcM fue estimada en triple análisis mediante ensayos ELISA en los que una cantidad determinada de AcM compitió entre 1 μg /pocillo de PLY adsorbida a la placa y diluciones seriadas 1:10 de PLY libre en solución. Las afinidades relativas estimadas por este método de los AcM antiPLY-1, antiPLY-2 y antiPLY-3 fueron $4,5 \times 10^{-11}\text{M}$, $4,7 \times 10^{-10}\text{M}$ y $8,5 \times 10^{-10}\text{M}$, respectivamente.

La adscripción de los AcM a grupos específicos de complementación se hizo en base a los resultados de ensayos ELISA de inhibición cruzada entre ellos, realizados por triplicado. Para ello, se obtuvieron formas biotilinas de cada uno de los AcM.

En primer lugar, 100 μl de diluciones seriadas 1:10 del primer AcM inhibidor, empezando por 10 μg de AcM/pocillo, reaccionaron con 1 μg de PLY/pocillo. Posteriormente, se añadió el segundo AcM biotilinas. La reacción de éste con la PLY fue medida tras incubación con ImmunoPure^R Streptavidin conjugada con peroxidasa de rábano (Pierce).

En los diagramas que componen la figura 1, se indican los porcentajes de reacción derivados de las medidas de absorción óptica que fueron obtenidos tras aplicar los siguientes criterios:

- 1) la absorbancia óptica de los pocillos, en los que un determinado AcM biotilinas con 10 μg de su propia forma nativa (auto-inhibición), fue considerada como blanco;
- 2) las demás absorbancias ópticas fueron medidas tras sustracción de la media de los blancos; y
- 3) la absorbancia óptica de los pocillos a los que no se añadió AcM inhibidor se estimó equivalente a un 100% de reacción.

En la parte superior de cada uno de los gráficos de la Figura 1 se indica el AcM biotilinas que compitió con los AcM indicados en la parte izquierda. Como se aprecia, cada uno de los AcM ensayados pertenece a un grupo de complementación específico ya que no se observó inhibición entre ellos; el grado de reacción observado fue siempre superior al 50%. Todo ello indica que estos tres AcM reconocen epítopos distintos en la molécula de PLY. Más aún, y muy interesante, antiPLY-1 ejerce una fuerte modulación positiva sobre la subsiguiente interacción de antiPLY-3 con PLY (nótese que la escala del gráfico para antiPLY-3 es muy distinta a las que se indican en los otros dos gráficos superiores); el efecto recíproco no fue observado.

Un segundo tipo de evidencia de que los tres AcM aquí referidos reconocen epítopos distintos en la molécula de PLY fue obtenido a partir de ensayos ELISA tipo sandwich de captura de PLY libre. Cada uno de ellos fue empleado como primer AcM de captura, y ensayado con la forma biotilinas, de revelado, de los otros dos. Los ensayos así realizados - por triplicado - fueron siempre positivos, de acuerdo con lo esperado. Los controles, con un AcM de captura de especificidad irrelevante para PLY, fueron negativos.

Alícuotas de los hibridomas murinos secretores de los anticuerpos monoclonales antiPLY-1, antiPLY-2 y antiPLY-3 han sido depositados en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur, París con los números de registro I-1394, I-1395 e I-1396 respectivamente.

En resumen, se han generado tres hibridomas murinos secretores de tres AcM distintos que:

- a) tienen distinta afinidad por la PLY;
- b) reconocen distintos epítopos en la molécula de PLY;
- c) se han demostrado útiles en ensayos ELISA tipo sandwich para proceder a la inmunodetección de PLY en muestras biológicas y
- d) poseen capacidad neutralizante de la actividad hemolítica in vitro de la neumolisina.

TABLA 1

Características de los anticuerpos monoclonales (a) antineumolisina

	Reactividad con				Capacidad neutralizante (ng monoclonal /UH de PLY(b))
	PLY		SLO		
	ELISA	IB	ELISA	IB	
Monoclonal(a)	ELISA	IB	ELISA	IB	/UH de PLY(b)
antiPLY-1	8	3+	-	-	31.2
antiPLY-2	2	3+	-	-	≤ 0.5
antiPLY-3	5	3+	-	+/-	1
control	-	-	-	-	-

a: Todos ellos son monoclonales murinos IgG1, Kappa

PLY: neumolisina

SLO: estreptolisina O

ELISA: 1 μg /pocillo de antígeno y 50 ng de monoclonal. El control fué un monoclonal del mismo isotipo sin reactividad para la neumolisina.-: No se produjo desarrollo de color. La absorbancia óptica fué medida tras sustracción de la correspondiente a la media de los blancos. Las medidas de absorbancia, de 0,01 a 0,60, fueron cuantificadas de acuerdo con un rango de 10 intervalos iguales.

IB: inmunoblotting desarrollado con 500 ng de antígeno por banda y 5 μg de monoclonal.
-: No se produjo desarrollo de color

+/-: Color muy débil

3+: Color intenso.

b: 1 UH (unidad hemolítica) fué definida como la cantidad de toxina requerida para lisar el 50% de los eritrocitos ensayados.

-: 1 μg de monoclonal no tuvo capacidad neutralizante

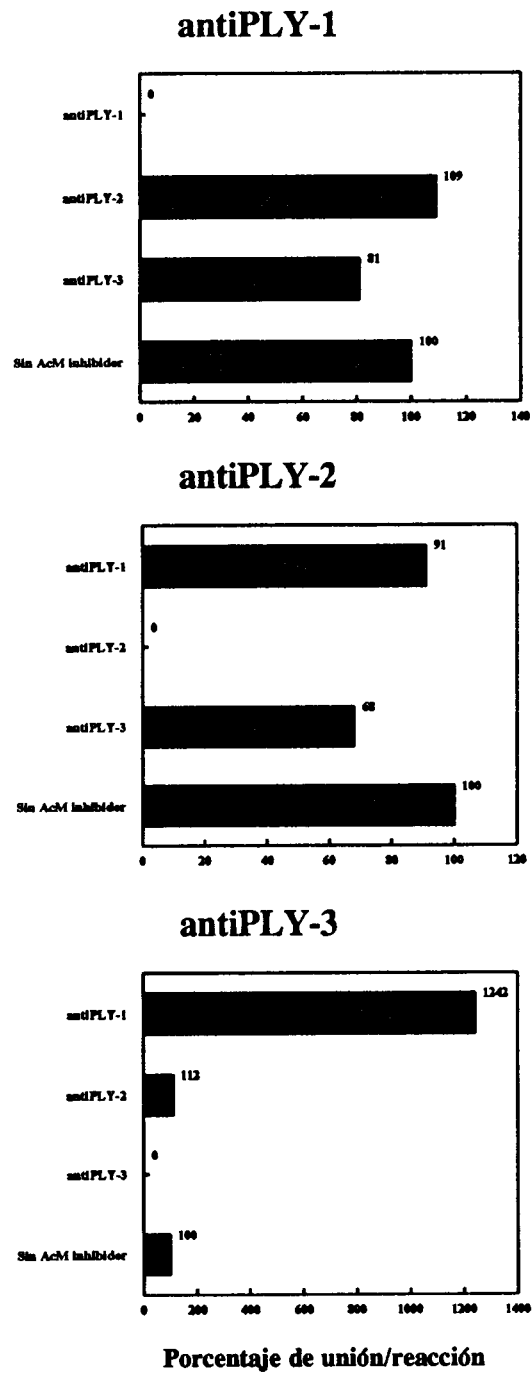


Figura 1

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprenda uno o varios anticuerpo(s) monoclonal(es) o derivados suyos que reaccione(n) específicamente con la neumolisina, que tenga(n) capacidad neutralizante de sus propiedades hemolíticas y que bloquee(n) los epitopos reconocidos por los anticuerpos antiPLY-1, antiPLY-2 y/o antiPLY-3.
2. Una composición que comprenda fragmentos, o formas derivatizadas o modificadas, de cualquier naturaleza, obtenidos por cualquier tipo de método, de cualesquiera de los anticuerpos mencionados en la reivindicación 1.
3. El uso de una composición, según una de las reivindicaciones 1 y 2, para el diagnóstico de las infecciones neumocócicas.
4. El uso de una composición, según una de las reivindicaciones 1 y 2, en la identificación, purificación o separación de neumolisina nativa o recombinante, o fragmentos o derivados de cualesquiera de ellas.
5. Una composición, de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, que comprenda un anticuerpo monoclonal o un derivado suyo que resulte protector frente a infecciones neumocócicas *in vivo*.
6. Una composición, de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 y 5, que comprenda un anticuerpo monoclonal o un derivado suyo que pueda ser utilizado junto con otros principios, tales como otros anticuerpos monoclonales, o cualquier antibiótico o agente antimicrobiano, para el tratamiento de infecciones neumocócicas.
7. Una línea celular designada con el número de acceso CNCM I-1394, que produce el anticuerpo monoclonal antiPLY-1, según la reivindicación 1.
8. Una línea celular designada con el número de acceso CNCM I-1395, que produce el anticuerpo monoclonal antiPLY-2, según la reivindicación 1.
9. Una línea celular designada con el número de acceso CNCM I-1396, que produce el anticuerpo monoclonal antiPLY-3, según la reivindicación 1.
10. Una línea celular generada total o parcialmente a partir de cualesquiera de las líneas celulares de las reivindicaciones 7, 8 y 9.
11. Una composición, de acuerdo con las reivindicaciones 7, 8, 9 y 10, que incluya cualquier componente o producto derivado originariamente de cualesquiera de las líneas celulares referenciadas en dichas reivindicaciones.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 088 820
⑫ N.º solicitud: 9400265
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 14.02.94
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C07K 16/12, C12N 5/18, A61K 39/395

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PATON J.C. et al. "Molecular analysis of the pathogenicity of Streptococcus pneumoniae: The Role of Pneumococcal Proteins" Annual Review Microbiology. 1993. Vol. 47, páginas 89-115 * Páginas 92-98 *	1-11
A	WO-9321305-A (GLOBAL TEK DIAGNOSTICS INC) 28.10.93 * Todo el documento *	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

16.08.96

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1