

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 054 852**

21 Número de solicitud: 202530875

51 Int. Cl.:

C12Q 1/25 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/38 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

10.06.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.02.2026

62 Número y fecha presentación solicitud inicial:

P 202430470 10.06.2024

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE MURCIA (100,00%)
Avda. Teniente Flomesta 5
30003 Murcia (Murcia) ES**

72 Inventor/es:

**CERÓN MADRIGAL, José Joaquín;
MARTÍNEZ SUBIELA, Silvia;
MUÑOZ PRIETO, Alberto;
LLAMAS AMOR, Eva y
LÓPEZ MARTÍNEZ, María José**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **ANTICUERPO QUE RECONOCE SERPINA B12, KIT QUE LO COMPRENDE Y USO DE LOS MISMOS**

57 Resumen:

Anticuerpo que reconoce serpina B12, kit que lo comprende y uso de los mismos.

Anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la proteína serpina B12 y kit que lo comprende para uso en un método in vitro para distinguir una infección bacteriana de una infección vírica en un mamífero, basado en determinar la cantidad o la concentración de serpina B12 en muestras biológicas de dicho mamífero.

ES 3 054 852 A2

DESCRIPCIÓN

ANTICUERPO QUE RECONOCE SERPINA B12, KIT QUE LO COMPRENDE Y USO DE LOS MISMOS

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se relaciona con anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente la proteína serpina B12 y kits que los comprenden. La presente invención también se relaciona con usos de anticuerpos monoclonales o kits que los comprenden para determinar la cantidad o la concentración de serpina B12 en muestras biológicas. La presente invención se relaciona, adicionalmente, con métodos para distinguir una infección bacteriana
10 de una infección vírica en un mamífero, basados en determinar la cantidad o la concentración de serpina B12 en muestras biológicas de dicho mamífero.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La serpina B12 es un inhibidor de proteinasas, como la tripsina y la plasmina. La serpina B12 es una proteína que protege a las células del daño producido por las proteasas y está
15 relacionada con los efectos defensivos y compensatorios del organismo frente a infecciones bacterianas.

Existe la necesidad en el estado de la técnica de obtener anticuerpos que reconocen específicamente a la serpina B12 y procedimientos que permitan determinar de forma fiable
20 la concentración la serpina B12 en muestras biológicas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente memoria, “CDR” (del inglés “complementarity-determining region”) o “región determinante de la complementariedad” se refiere a una secuencia de aminoácidos que se encuentra en los dominios variables de los anticuerpos que les proporciona su especificidad
25 por el antígeno.

En la presente memoria, “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)” hace referencia a una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo unido a una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.) capaz de generar un producto detectable a partir de un sustrato, por medio de un cambio de color o
30 algún otro tipo de cambio, provocado por la acción enzimática sobre dicho sustrato. En dicha

técnica puede existir un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario unido a dicha enzima. El antígeno se puede detectar indirectamente en la muestra mediante los cambios de color medidos por espectrofotometría.

En la presente memoria, “valor de referencia” se refiere a la cantidad o la concentración de serpina B12 en muestras de referencia de mamíferos sanos (que no sufren ni infección bacteriana, ni infección vírica), obtenida de mamíferos de la misma especie que el mamífero del que se ha obtenido la muestra ensayada. Este valor de referencia puede ser una cifra discreta o un rango de valores. Preferentemente, se puede usar un valor de corte como un valor de referencia.

En la presente memoria, “comparar” se refiere a contrastar la cantidad o la concentración de serpina B12 en una muestra biológica con un valor de referencia. La comparación puede ser llevada a cabo manualmente o asistida por ordenador. En el caso de una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada puede compararse con los valores correspondientes a las referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos mediante un programa informático (software) y dicha comparación puede llevarse a cabo vía algoritmo de un programa informático (software), diseñado a tales efectos.

En la presente memoria, “aumento en la comparación” se refiere a un aumento de la cantidad o concentración de serpina B12 en la muestra biológica analizada, respecto al valor de referencia. Preferentemente, dicho aumento es estadísticamente significativo. Se puede determinar si un aumento es estadísticamente significativo, utilizando diversas herramientas de evaluación estadística, bien conocidas en la técnica, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza y determinación del valor p. Los intervalos de confianza preferidos son al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%. Los niveles de significación de las pruebas estadísticas son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

El problema técnico a resolver consiste en proporcionar un anticuerpo monoclonal mejorado que reconozca específicamente a la serpina B12.

La presente invención soluciona dicho problema técnico con el anticuerpo monoclonal de la invención.

Adicionalmente, el problema técnico a resolver también consiste en proporcionar un método *in vitro* para distinguir una infección bacteriana de una infección vírica en un mamífero

La presente invención soluciona dicho problema técnico con un método *in vitro* basado en la determinación de la cantidad o la concentración de serpina B12 en una muestra biológica obtenida de dicho mamífero.

5

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente a la serpina B12, en el que dicho anticuerpo comprende:

- una región CDR1 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3;
- una región CDR2 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4;
- 10 - una región CDR3 de la cadena pesada que consiste en la secuencia LGY;
- una región CDR1 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 8;
- una región CDR2 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 9; y
- una región CDR3 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10.

- 15 El anticuerpo monoclonal de la invención es una Inmunoglobulina G (IgG). Un anticuerpo monoclonal IgG contiene cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Cada cadena tiene una región variable responsable del reconocimiento de antígeno, de forma que el anticuerpo tiene un dominio variable de la cadena ligera (denominado dominio V_L) y un dominio variable de la cadena pesada (denominado
- 20 dominio V_H).

- En realizaciones del anticuerpo de la invención, la serpina B12 es de mamíferos. Preferentemente, el mamífero se selecciona del grupo que consiste en cerdos, perros, equinos y humanos. Más preferentemente, el mamífero es un cerdo. La secuencia de la serpina B12 porcina es accesible al público en la base de datos de secuencias del “National
- 25 Center for Biotechnology Information” (NCBI, Estados Unidos). El número de referencia de la secuencia de la serpina B12 porcina en dicha base de datos (en fecha 3 de junio de 2024) es “NCBI Reference Sequence: XP_020930953.1”.

- En realizaciones del anticuerpo de la invención, el dominio variable de la cadena pesada tiene
- 30 al menos un 95% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 y el dominio variable de la cadena ligera tiene al menos un 95% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 7.

En realizaciones preferentes del anticuerpo de la invención, el dominio variable de la cadena pesada tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad respecto a la secuencia

SEQ ID NO: 2 y el dominio variable de la cadena ligera tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 7.

5 En realizaciones del anticuerpo de la invención, el dominio variable de la cadena pesada consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2 y el dominio variable de la cadena ligera consiste en la secuencia SEQ ID NO: 8.

10 En realizaciones del anticuerpo de la invención, el anticuerpo está unido a una esfera o a una sonda de marcaje. Preferentemente, la esfera está unida a una sonda de marcaje.

En realizaciones del anticuerpo de la invención, la sonda de marcaje se selecciona del grupo que consiste en un fluoróforo, un cromóforo, una sonda bioluminiscente, una sonda radiactiva, una enzima y oro coloidal.

15 La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica para el anticuerpo de la invención.

20 En realizaciones del polinucleótido de la invención, éste comprende las secuencias SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15. La secuencia SEQ ID NO: 13 codifica para el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de la invención y la secuencia SEQ ID NO: 15 codifica para el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo de la invención. En una realización preferente del polinucleótido de la invención, éste comprende las secuencias SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14. La secuencia SEQ ID NO: 12 codifica para la cadena pesada del anticuerpo de la invención y la secuencia SEQ ID NO: 14 codifica para la cadena ligera del anticuerpo de la invención.

La presente invención proporciona, adicionalmente, una célula que comprende el polinucleótido de la invención.

30 En realizaciones, la célula de la invención es un hibridoma.

La presente invención también proporciona el uso del polinucleótido de la invención o de la de la célula de la invención, para producir el anticuerpo de la invención.

La presente invención proporciona, adicionalmente, un kit que comprende el anticuerpo de la invención.

5 En realizaciones, el kit de la invención además comprende al menos un reactivo para detectar la cantidad o la concentración de inmunocomplejos formados por anticuerpo unido a la serpina B12.

En realizaciones, el kit de la invención además comprende al menos una disolución tampón.

10 La presente invención proporciona, además, el uso del anticuerpo o del kit de la invención, para determinar *in vitro* la cantidad o la concentración de serpina B12 en una muestra biológica.

15 En realizaciones, el uso del anticuerpo o del kit de la invención comprende llevar a cabo un ensayo que comprende:

- (a) añadir a la muestra biológica el anticuerpo de la invención;
- (b) determinar la cantidad o la concentración de inmunocomplejos que comprenden el anticuerpo unido a la serpina B12; y
- (c) determinar la cantidad o la concentración de serpina B12 en la muestra biológica a
20 partir de la cantidad o la concentración de los inmunocomplejos que comprenden el anticuerpo unido a la serpina B12.

25 El uso del anticuerpo o del kit de la invención, además de poder ser implementado en cualquier laboratorio, está especialmente indicado para ser llevado a cabo en modo ambulatorio, *in situ*, por ejemplo, en las propias granjas de cría de animales.

30 En realizaciones del uso del anticuerpo o del kit de la invención, el ensayo se selecciona del grupo que consiste en inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, luminiscencia, ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada, inmunoelectrotransferencia, ELISA, Western Blot, nefelometría, inmunoturbidimetría, cromatografía lateral y micromatrices.

35 En realizaciones del uso del anticuerpo o del kit de la invención, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en fluido biológico, tejido biológico, suero, plasma, sangre, saliva, orina, heces, lágrimas y líquido cefalorraquídeo.

Preferentemente, la muestra biológica es saliva. Determinar la cantidad o la concentración de
serpina B12 en saliva presenta ventajas en comparación con otros tipos de muestra, ya que
puede obtenerse de manera simple, sin producir estrés o dolor. Por esta razón, las muestras
de saliva se utilizan cada vez más para la determinación de biomarcadores de estrés o
bienestar en animales, preferentemente en los cerdos.

En una realización preferente del uso del anticuerpo o del kit de la invención, el anticuerpo de
la invención está unido a esferas y se añade a una concentración de 10 a 15 µg/mL a la
muestra biológica.

En una realización preferente del uso del anticuerpo o del kit de la invención, el tiempo de
incubación del anticuerpo con la muestra biológica es de 1 a 2 horas.

En los ejemplos de la invención se ha encontrado que la serpina B12 aumenta en saliva en
situaciones de infecciones producidas por agentes bacterianos, pero no cambia en sus
concentraciones en infecciones causadas por agentes víricos y de ello se deriva que la serpina
B12 es un biomarcador que diferencia entre una infección bacteriana y una vírica. Esto permite
que, cuando no se identifica un aumento en la comparación realizada y el mamífero sufre una
infección vírica confirmada previamente, determinar que dicho mamífero no sufre una
infección bacteriana concomitante. Ello es de suma importancia, por ejemplo, en el caso de
animales de granja, para descartar infecciones bacterianas y evitar dar antibióticos a dichos
animales. Conviene resaltar que el uso de antibióticos puede ocasionar restricciones en
productos derivados de animales de granja, por la regulación existente en dicho ámbito.

Por ello, la presente invención también proporciona un método *in vitro* para distinguir una
infección bacteriana de una infección vírica en un mamífero, que comprende:

- (a) determinar la cantidad o la concentración de serpina B12 en una muestra biológica
obtenida de dicho mamífero;
- (b) comparar la cantidad o la concentración de serpina B12 con un valor de referencia de
la misma especie que el mamífero del que se ha obtenido la muestra de la etapa (a);
y
- (c) determinar que, cuando no se identifica un aumento en la comparación realizada y el
mamífero sufre una infección vírica confirmada previamente, determinar que dicho
mamífero no sufre una infección bacteriana concomitante.

En realizaciones del método de la invención, en la etapa (a), se determina la cantidad o la concentración de serpina B12 usando el anticuerpo de la invención.

- 5 En realizaciones del método de la invención, en la etapa (b), el valor de referencia es la cantidad o la concentración de serpina B12 en una población de mamíferos sanos, de la misma especie que el mamífero del que se ha obtenido la muestra biológica ensayada.

10 En realizaciones del método de la invención, el mamífero se selecciona del grupo que consiste en cerdos, perros, equinos y humanos.

En realizaciones del método de la invención, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en fluido biológico, tejido biológico, suero, plasma, sangre, saliva, orina, heces, lágrimas y líquido cefalorraquídeo.

15 En la presente memoria, las formas singulares “el”, “la” incluyen referencias a las formas plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

20 En la presente memoria, el término “comprende”, “que comprende” y sus variantes no son de naturaleza limitativa y, por lo tanto, no pretenden excluir otras características técnicas. El término “comprende”, “que comprende” y sus variantes, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, incluye, específicamente, el término “consiste en”, “que consiste en” y sus variantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 **Figura 1.** Concentraciones de serpina B12 en la saliva de los cerdos, determinadas con un ensayo AlphaLISA® (Perkin Elmer, Inc.) con el anticuerpo monoclonal 13G9C5-1, tras una administración experimental de lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) a 5 cerdos. (T0 = antes de administrar LPS (control); T3 = 3 horas después de administrar LPS; T24 = 24 horas después de administrar LPS; T48 = 48 horas después de administrar LPS). Los asteriscos indican
30 diferencias significativas (** $P < 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P < 0,05$).

Figura 2. Concentraciones de serpina B12 en la saliva de cerdos sanos y cerdos infectados por el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS, por sus siglas en inglés,

de "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome"), determinadas con un ensayo AlphaLISA® (Perkin Elmer, Inc.) con el anticuerpo monoclonal 13G9C5-1.

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Materiales y métodos

- 5 Se recogieron muestras de saliva de cerdo usando tubos de Salivette (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co.) que contenían una esponja. Se permitió a los cerdos masticar la esponja, que se sujetó a una varilla de metal delgada y flexible, hasta que estuvo completamente húmeda (o al menos 1 minuto). Luego, las esponjas se colocaron en los tubos de Salivette que se centrifugaron inmediatamente a 3000 g durante 10 minutos a 4 °C.
- 10 Seguidamente, se transfirió la saliva a tubos de 1,5 ml y se almacenó a -80 ° C hasta el análisis. En todos los casos se obtuvieron al menos 500 microlitros de saliva. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia.

Ejemplo 2. Producción y caracterización del anticuerpo monoclonal 13G9C5-1 que reconoce específicamente serpina B12

- 15 Se inmunizaron 5 ratones (BALB/c) con dos inyecciones intraperitoneales separadas por un intervalo de 15 días con 50 µg de serpina B12 recombinante como antígeno. Días después de cada inmunización, se evaluó la respuesta de anticuerpos de los sueros de los animales inmunizados mediante ELISA indirecto.
- 20 Se cultivaron órganos linfoides secundarios de ratones seleccionados para una ronda de fusión celular mediante el método de electrofusión. Las células fusionadas se colocaron en placas de 96 pocillos. Posteriormente se realizaron dos cribados: un cribado primario mediante ELISA indirecto con serpina B12 y un cribado de confirmación mediante ELISA indirecto de los clones primarios positivos usando tanto la serpina B12 como una proteína no
- 25 relevante. Se seleccionaron los 10 mejores clones para realizar una ronda de subclonación y obtener los clones únicos. Todos los subclones elegidos en la fase de subclonación se utilizaron para la purificación de anticuerpos de 0,5-1mg/clon. El anticuerpo purificado se biotinó y cada pareja de anticuerpos se ensayó mediante ELISA tipo sándwich para definir las mejores 3 parejas de anticuerpos de captura y detección. Tras esto, se seleccionaron 5 clones
- 30 confirmatorios positivos de la fase III como clones parentales y se subclonaron mediante dilución límite para líneas celulares monoclonales. Por cada clon parental se seleccionaron dos subclones hermanos individuales para criopreservación. A todas las líneas celulares

monoclonales elegidas se les realizó la identificación del isotipo y se almacenaron para la realización de pruebas posteriores de selección.

Se realizó un análisis de los sobrenadantes de los hibridomas generados mediante ensayo
 5 ELISA indirecto empleando serpina B12. Para ello, en microplacas de 96 pocillos de fondo plano Nunc (Maxisorp), se incubaron con 50 µl de serpina B12 (250 ng antígeno por pocillo) en tampón carbonato-bicarbonato, pH 9,8, durante toda la noche, a 4°C, para permitir la correcta adhesión de las proteínas a la placa. Posteriormente, las placas fueron lavadas con 100 µl de PBS/Tween 20 al 0,05% y bloqueadas durante 30 minutos a 37°C con 100 µl de
 10 tampón de bloqueo fosfato salino (PBS) con 5% leche en polvo. A continuación, las placas se incubaron 1 hora a 37°C, con 100 µl por pocillo de cada sobrenadante procedente de los hibridomas. Seguidamente, se realizaron tres lavados con tampón PBS/Tween 20 al 0,1%. Entonces, se añadió 100 µl por pocillo de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano a una dilución 1:2500 y se incubó durante 1 hora a temperatura
 15 ambiente. Después de 5 lavados con tampón PBS/Tween 20 al 0,1%, para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, se añadió el sustrato enzimático en solución (citrato sódico 0,1M, ácido cítrico 0,1 M, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) y H₂O₂). Posteriormente, se midió la absorbancia (OD) en un espectrofotómetro (BioTek) a una longitud de onda de 405 nm cada 5 minutos
 20 hasta un total de 25 minutos.

Se identificó el anticuerpo específico anti-serpina B12 en el sobrenadante del hibridoma 13G9C5-1 en dicho ensayo ELISA indirecto empleando serpina B12. Se seleccionó el clon 13G9C5-1 porque se obtuvo la mayor señal de absorbancia con dicho clon en dicho ensayo
 25 ELISA, lo que indicaba una mayor afinidad por la serpina B12 que el resto de clones.

El ARN total se extrajo de las células de hibridoma y el ADNc se sintetizó posteriormente. Después, se amplificaron por PCR las secuencias de ADNc de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo monoclonal. Las secuencias amplificadas se clonaron en un vector de
 30 clonación y se secuenciaron. Se determinó que el isotipo del anticuerpo monoclonal era IgG1kappa. Se obtuvieron las secuencias de ADN de los anticuerpos monoclonales obtenidos de 5 clones y se encontró que la secuencia era idéntica en los 5 clones. A partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas del anticuerpo monoclonal 13G9C5-1 (**Tabla 2**), se determinaron las secuencias de aminoácidos de dicho anticuerpo monoclonal (**Tabla 1**).

35

Tabla 1

Región	Secuencia
Cadena pesada	SEQ ID NO: 1
Dominio variable de la cadena pesada	SEQ ID NO: 2
Región CDR1 del dominio variable de la cadena pesada	SEQ ID NO: 3
Región CDR2 del dominio variable de la cadena pesada	SEQ ID NO: 4
Región CDR3 del dominio variable de la cadena pesada	LGY
Dominio constante de la cadena pesada	SEQ ID NO: 5
Cadena ligera	SEQ ID NO: 6
Dominio variable de la cadena ligera	SEQ ID NO: 7
Región CDR1 del dominio variable de la cadena ligera	SEQ ID NO: 8
Región CDR2 del dominio variable de la cadena ligera	SEQ ID NO: 9
Región CDR3 del dominio variable de la cadena ligera	SEQ ID NO: 10
Dominio constante de la cadena ligera	SEQ ID NO: 11

Tabla 2

Región	Secuencia
Secuencia nucleotídica que codifica para la cadena pesada	SEQ ID NO: 12
Secuencia nucleotídica que codifica para el dominio variable de la cadena pesada	SEQ ID NO: 13
Secuencia nucleotídica que codifica para la cadena ligera	SEQ ID NO: 14
Secuencia nucleotídica que codifica para el dominio variable de la cadena ligera	SEQ ID NO: 15

5 Se purificó el anticuerpo monoclonal a partir del sobrenadante obtenido del hibridoma 13G9C5-1, usando para ello una columna de afinidad HiTrap™ Protein A HP (GE Healthcare Life Sciences) en un sistema de cromatografía ÄKTA pure (GE Healthcare Life Sciences). Se utilizó el anticuerpo monoclonal 13G9C5-1 purificado en las determinaciones de las concentraciones de serpina B12 de los Ejemplos 3 y 4.

10 **Ejemplo 3. Determinación de las concentraciones de serpina B12 con el anticuerpo monoclonal 13G9C5-1 en muestras de saliva de cerdos con sepsis inducida por un agente bacteriano**

La administración de lipopolisacárido de patógenos Gram negativos es un modelo experimental reconocido de inducción de sepsis en mamíferos. La sepsis es un síndrome de
15 respuesta inflamatoria sistémica desencadenado por un agente infeccioso.

Se emplearon 5 cerdos macho en fase de engorde y pertenecientes a la Granja Experimental de la Universidad de Murcia (Murcia, España). Todos tenían agua y una dieta equilibrada ad-libitum y fueron alojados con un espacio mínimo de 0,65 m² por cerdo de acuerdo con la
20 Directiva del Consejo 2001/88/CE de 23 de octubre de 2001 modificando la Directiva

91/630/CEE y una temperatura estándar 24 ± 2 °C. Durante el estudio, los cerdos tuvieron 14 semanas de edad y un peso medio de 51,5 kg.

Antes de empezar el ensayo, los animales se adaptaron a las condiciones experimentales durante una semana. Posteriormente, los animales recibieron una dosis de 30 µg/kg de lipopolisacárido de *E. coli* (O55:B5, Sigma-Aldrich) reconstituida en una solución salina estéril mediante inyección intramuscular. Se recogieron muestras de saliva de los cerdos a distintos tiempos y se almacenaron las muestras a -80°C hasta el análisis, tal y como se describe en el Ejemplo 1. Se descongelaron a temperatura ambiente las muestras de saliva y se diluyeron 1:10 en tampón de ensayo (AlphaLISA® Universal buffer, Perkin Elmer, Inc.). Se realizó un ensayo AlphaLISA® (Perkin Elmer, Inc.), en placas de 96 pocillos, con un volumen de reacción de 50 µL por pocillo, utilizando esferas recubiertas con el anticuerpo monoclonal 13G9C5-1 y se determinaron las concentraciones de serpina B12 en las muestras.

Las concentraciones de serpina B12 determinadas en los cerdos con sepsis inducida por lipopolisacárido de *E. coli* se muestran en la **Figura 1**. Se observa un aumento de las concentraciones de serpina B12 en saliva en los cerdos con sepsis inducida por lipopolisacárido de *E. Coli*.

Ejemplo 4. Determinación de las concentraciones de serpina B12 con el anticuerpo monoclonal 13G9C5-1 en muestras de saliva de cerdos con infección vírica

Se emplearon 44 cerdos macho en fase de engorde y pertenecientes a la Granja Experimental de la Universidad de Murcia (Murcia, España). Todos tenían agua y una dieta equilibrada ad libitum y fueron alojados con un espacio mínimo de 0,65 m² por cerdo de acuerdo con la Directiva del Consejo 2001/88/CE de 23 de octubre de 2001 modificando la Directiva 91/630/CEE y una temperatura estándar 24 ± 2 °C. Durante el estudio, los cerdos tuvieron 14 semanas de edad y un peso medio de 51,5 kg.

Antes de empezar el ensayo, los animales se adaptaron a las condiciones experimentales durante una semana y posteriormente se dividieron en dos grupos. El primer grupo (n=22) eran cerdos que dieron positivo por PCR a la infección por el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino y que tenían síntomas respiratorios. El segundo grupo (n=22) eran cerdos que dieron negativo por PCR a la infección por dicho virus y que no tenían síntomas.

Se recogieron muestras de saliva de los dos grupos de cerdos y se almacenaron las muestras a -80°C hasta el análisis, tal y como se describe en el Ejemplo 1. Se descongelaron a temperatura ambiente las muestras de saliva y se diluyeron 1:10 en tampón de ensayo (AlphaLISA® Universal buffer, Perkin Elmer, Inc.). Se realizó un ensayo AlphaLISA® (Perkin Elmer, Inc.), en placas de 96 pocillos, con un volumen de reacción de 50 µL por pocillo, utilizando esferas recubiertas con el anticuerpo monoclonal 13G9C5-1 y se determinaron las concentraciones de serpina B12 en las muestras.

Las concentraciones de serpina B12 determinadas en los dos grupos de cerdos se muestran en la **Figura 2**. No hay diferencias significativas entre las concentraciones de cada grupo de cerdos al tratarse de una infección vírica.

Los resultados del Ejemplo 3 y 4 demuestran que la serpina B12 aumenta en saliva en situaciones de infecciones producidas por agentes bacterianos, pero no cambia en sus concentraciones en problemas causados por agentes víricos y de ello se deriva que la serpina B12 es un biomarcador que diferencia entre una infección bacteriana y una vírica.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para distinguir una infección bacteriana de una infección vírica en un mamífero, que comprende:
 - 5 (a) determinar la cantidad o la concentración de serpina B12 en una muestra biológica obtenida de dicho mamífero;
 - (b) comparar la cantidad o la concentración de serpina B12 con un valor de referencia de la misma especie que el mamífero del que se ha obtenido la muestra de la etapa (a); y
 - 10 (c) determinar que, cuando no se identifica un aumento en la comparación realizada y el mamífero sufre una infección vírica confirmada previamente, determinar que dicho mamífero no sufre una infección bacteriana concomitante.
2. El método según la reivindicación 1, en el que, en la etapa (a), se determina la cantidad o la concentración de serpina B12 usando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente a la serpina B12, o un kit que lo contenga, en el que dicho anticuerpo comprende:
 - una región CDR1 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3;
 - una región CDR2 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4;
 - 20 - una región CDR3 de la cadena pesada que consiste en la secuencia LGY;
 - una región CDR1 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 8;
 - una región CDR2 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 9; y
 - una región CDR3 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo monoclonal comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos un 95% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 y en el que el dominio variable de la cadena ligera tiene al menos un 95% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 7.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo monoclonal comprende un dominio variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2 y en el que el dominio variable de la cadena ligera consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7.

5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo está unido a una esfera o a una sonda de marcaje.
- 5 6. El método según la reivindicación 5, en el que la esfera está unida a una sonda de marcaje.
7. El método según la reivindicación 5 o 6, en el que la sonda de marcaje se selecciona del grupo que consiste en un fluoróforo, un cromóforo, una sonda bioluminiscente, una sonda radiactiva, una enzima y oro coloidal.
- 10 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que cuando el anticuerpo está unido a una esfera se añade a una concentración de 10-15 µg/ml a la muestra biológica.
- 15 9. El método según la reivindicación 1 a 8, en el que, en la etapa (b), el valor de referencia es la cantidad o la concentración de serpina B12 en una población de mamíferos sanos, de la misma especie que el mamífero del cual se ha obtenido la muestra biológica.
- 20 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el mamífero se selecciona del grupo que consiste en cerdos, perros, equinos y humanos.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en fluido biológico, tejido biológico, suero, plasma, sangre, saliva, orina, heces, lágrimas y líquido cefalorraquídeo.
- 25 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la muestra biológica es una muestra de saliva.
- 30 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la determinación de la cantidad o de la concentración de serpina B12 se hace mediante un ensayo seleccionado del grupo que consiste en inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, luminiscencia, ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada, inmunoelectrotransferencia, ELISA, Western Blot, nefelometría, 35 inmunoturbidimetría, cromatografía lateral y micromatrices.

14. El método según cual quiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que cuando se utiliza un kit que comprende el anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente serpina B12, dicho kit además comprende al menos un reactivo para detectar la cantidad o la concentración de inmunocomplejos formados por el anticuerpo unido a la serpina B12.
- 5
15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que cuando se utiliza un kit que comprende el anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente serpina B12, dicho kit además comprende al menos una disolución tampón.
- 10
16. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el tiempo de incubación del anticuerpo con la muestra biológica es de 1 a 2 horas.
17. Un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente a la serpina B12, o un kit que lo contenga, en el que dicho anticuerpo comprende:
- 15
- una región CDR1 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3;
 - una región CDR2 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4;
 - una región CDR3 de la cadena pesada que consiste en la secuencia LGY;
 - una región CDR1 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 8;
 - una región CDR2 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 9; y
- 20
- una región CDR3 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10;
- para uso en un método *in vitro* para distinguir una infección bacteriana de una infección vírica en un mamífero, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
18. Un anticuerpo monoclonal o un kit que lo contenga para uso, según la reivindicación
- 25
- 17, en el que dicho uso se lleva a cabo en modo ambulatorio, in situ.
19. Un anticuerpo monoclonal o un kit que lo contenga para uso, según la reivindicación
- 18, en el que dicho uso se lleva a cabo en las propias granjas de cría de animales.

30

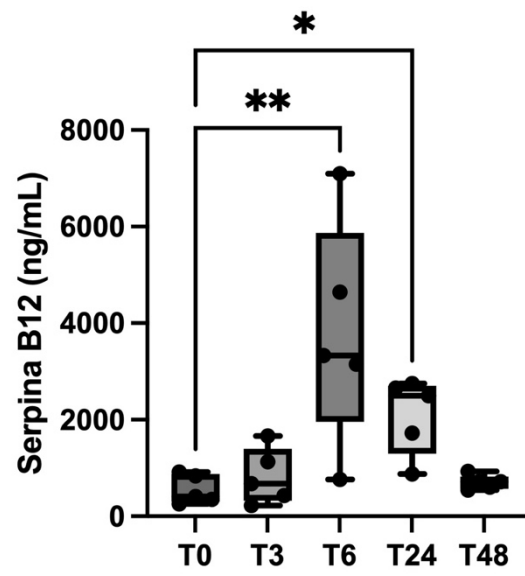


FIGURA 1

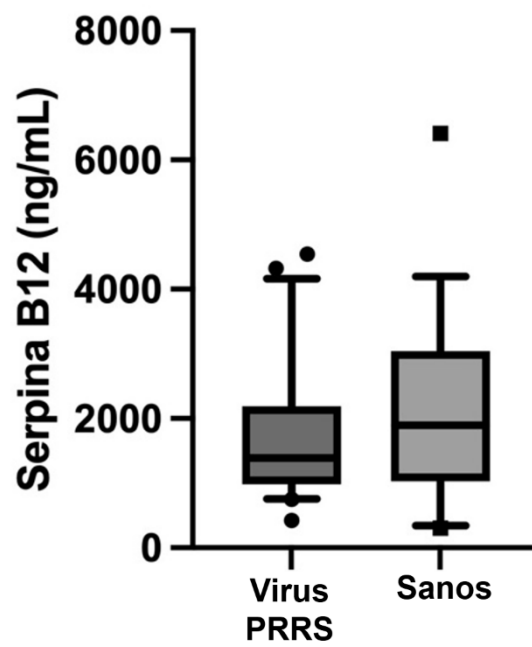


FIGURA 2