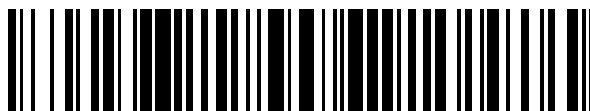


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 888**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2016 PCT/IB2016/054424**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17021815**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2016 E 16832387 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3328884**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal específico para la proteína P del Virus Respiratorio Sincicial humano y uso del mismo para la detección y diagnóstico de infección por VRS**

30 Prioridad:

31.07.2015 CL 20152152

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

01.10.2020

73 Titular/es:

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE (100.0%)

**Avenida Libertador Bernardo O'Higgins 340
8331150 Santiago, CL**

72 Inventor/es:

**BUENO RAMÍREZ, SUSAN MARCELA;
KALERGIS PARRA, ALEXIS MIKES y
MORA ALARCÓN, JORGE EUGENIO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 784 888 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 específico para la proteína P del Virus Respiratorio Sincicial humano y uso del mismo para la detección y diagnóstico de infección por VRS

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, que reconocen la proteína P del Virus Respiratorio Sincicial humano (VRSh), útiles para el desarrollo de métodos de diagnóstico de infección por VRSh en humanos.

Estado de la técnica

- 10 Las infecciones respiratorias causadas por virus son un problema de salud pública en todo el mundo. Los principales responsables de estas infecciones en la población pediátrica son: el Virus Respiratorio Sincicial humano (VRSh), Adenovirus (ADV), Virus Influenza A y B (INF A y B), Virus Parainfluenza (PIV) y el Metapneumovirus humano (hMPV). Actualmente no existen mecanismos efectivos de prevención contra estos virus y se produce diariamente un estimado de 94.000.000 casos nuevos (Organización Mundial de la Salud). La sobresaturación de los sistemas de salud asociada a los brotes, genera además sustanciales pérdidas económicas.

- 15 El VRSh es un virus que afecta el aparato respiratorio y representa en la actualidad un problema de gran relevancia económica y social, afectando con altos niveles de morbilidad y mortalidad a niños y ancianos. En estas poblaciones, especialmente en infantes y niños menores de dos años, VRSh causa una amplia variedad de cuadros clínicos, desde las formas más leves como rinitis, tonsilitis y otitis, a otras formas de mayor severidad como neumonías, bronquitis, bronquiolitis y alveolitis. Estudios serológicos estiman que entre el 70% y 100% de los niños se han
20 expuesto al menos una vez al virus a la edad de 1 y 2 años, respectivamente. Se ha estimado que anualmente VRSh causa un aproximado de 34 millones de infecciones, 3,4 millones de hospitalizaciones y cerca de 200 mil muertes en niños menores de 5 años. En la actualidad, VRSh es un virus de relevancia epidemiológica en Chile y Latinoamérica. Algunos estudios han demostrado que el porcentaje de casos de infecciones respiratorias causadas por VRSh en neonatos e infantes puede ser superior al 70% durante los brotes invernales. Estudios en
25 Latinoamérica por otra parte, refuerzan el rol de VRSh como principal agente infeccioso responsable de infecciones del tracto respiratorio bajo en individuos menores a 2 años, con una incidencia reportada de más del 40%. Lamentablemente, hoy en día no existen vacunas aprobadas para inmunizar neonatos, ni tratamientos eficientes para el control de la infección en esta población.

- VRSh es un virus ARN de aproximadamente 15,3 kb, encapsulado, con material genético de hebra simple y
30 polaridad negativa de codificación, perteneciente a la familia *Paramyxoviridae* y al género *Pneumovirus*. El genoma de VRSh codifica 10 genes ordenados de la siguiente manera 5'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-3', los cuales son transcritos por la polimerasa de ARN ARN-dependiente (proteína L) en 10 ARN mensajeros independientes. Cinco de estas proteínas son responsables del empaquetamiento del material genético y de definir la estructura propia de la partícula viral, correspondiendo a la proteína de nucleocápside N y la proteína de matriz M, junto a las glicoproteínas de membrana F, G y SH, respectivamente. Las otras cuatro proteínas, M2-1, M2-2, L y P, están involucradas en la replicación y transcripción viral. Adicionalmente, las proteínas NS-1 y NS-2 son no estructurales que reducen la expresión de interferón de tipo I por la célula infectada y, por lo tanto, previenen la activación de la respuesta inmune innata.

- 40 En los servicios de Salud Pública los métodos de diagnósticos actuales incluyen una prueba basada en la detección de antígenos virales por Inmunofluorescencia directa en muestras de hisopado nasofaríngeo, reacción en cadena de la polimerasa mediante transcripción reversa (RT-PCR) y prueba de inmunocromatografía (pruebas rápidas). De los productos mencionados, los paneles virales basados en Inmunofluorescencia son los más llamativos, debido a que estos permiten detectar un mayor número de virus respiratorios, siendo 12 tipos en el caso de Respiratory Viral Panel (RVP) PCR utilizing Luminex xTAG y 14 tipos para el eSensor Respiratory Viral Panel. Pese a este amplio
45 rango de detección, es importante notar los factores de coste y tiempo de respuesta que estos utilizan. En el caso de la primera prueba mencionada, el coste es aproximadamente 70 USD con un tiempo de respuesta entre 12 a 18 horas, mientras que la segunda prueba el coste es aproximadamente 90 USD y un tiempo de respuesta de 60 minutos.

- Por lo tanto, se hace fundamental contar con una prueba de diagnóstico eficaz, rápida y de bajo coste para la
50 detección de VRSh que pueda competir con las características de los métodos de diagnóstico disponibles. Ante tal problemática, la presente invención describe anticuerpos monoclonales que son una alternativa necesaria para suplir dicha necesidad, puesto que permiten el reconocimiento específico de antígenos virales en muestras de pacientes infectados con VRSh. De este modo la presente invención comprende productos tales como anticuerpos monoclonales, y un método alternativo que los usa para detección y diagnóstico rápido, eficaz y certero en pacientes
55 infectados con VRSh con un 100% de especificidad en muestras clínicas y capaces de detectar por ELISA concentraciones equivalentes a 1,5 ng del antígeno específico. Esto permitirá a los profesionales clínicos determinar un tratamiento temprano y adecuado.

Un anticuerpo monoclonal es un tipo de anticuerpo homogéneo que se caracteriza por reconocer específicamente un solo antígeno. Son producidos por una única célula híbrida (hibridoma), que es producto de la fusión de un clon de linfocito B y una célula plasmática tumoral. La propiedad de unirse específicamente y con alta afinidad a un antígeno ha impulsado el desarrollo de los anticuerpos monoclonales como una herramienta de gran utilidad para la detección de moléculas que generan un gran interés científico, clínico y de uso industrial. En la actualidad, los anticuerpos monoclonales son ampliamente utilizados, tanto en investigación básica como aplicada, debido a su especificidad y reproducibilidad, lo que permite fundamentar de mejor manera la investigación. Sin embargo, es en el área de la biomedicina donde los anticuerpos monoclonales han tenido enormes aplicaciones prácticas, ya sea para diagnóstico y tratamiento de múltiples enfermedades infecciosas, y como terapia para otras patologías. Si bien es cierto que los anticuerpos monoclonales se utilizan en todo tipo de técnicas de detección y diagnóstico, es en el diseño de kits para diagnóstico *in vitro* donde se han obtenido los mejores resultados. Para ello, existen en la actualidad diversos kits de detección rápida, tal como la prueba de embarazo, que se basa en la determinación de los niveles de gonadotropina coriónica (hCG) en la orina utilizando anticuerpo anti hCG. Además, los anticuerpos monoclonales para uso terapéutico han cobrado gran relevancia. En la actualidad existen tratamientos terapéuticos para distintas patologías, mediante el uso de anticuerpos monoclonales comerciales como: Alemtuzumab, Gemtuzumab, ozogamicina, Rituximab, Trastumab, entre otros.

En la técnica anterior existe la publicación WO2013076702, que describe el uso de un anticuerpo monoclonal específico para la detección del virus respiratorio sincicial, específicamente se describe un anticuerpo dirigido contra el antígeno M2-1, generado por nuestro laboratorio (Gómez et al, J Med Virol. 2014 Jul; 86(7):1256-66). Este anticuerpo se diferencia de la presente invención en que los anticuerpos monoclonales para la detección del VRSh tienen como antígeno a la proteína P, y no contra M2-1 como describe el documento citado. La ventaja de generar anticuerpos contra la proteína P es que estos al ser contra un antígeno diferente pueden ser utilizados en un inmunoensayo en conjunto con los anticuerpos anti-M2-1 (previamente publicados), aumentando la sensibilidad en la detección de los antígenos que se encuentran poco disponibles en las muestras nasofaríngeas. El documento US2014093501 describe un anticuerpo compuesto de cadenas variables pesadas y livianas de al menos un anticuerpo monoclonal murino, contra el VRS. Específicamente, el anticuerpo está dirigido a la proteína F. Esto se diferencia de la presente invención en que los anticuerpos monoclonales para la detección del VRSh tienen como antígeno a la proteína P, y no contra F como describe el documento citado. Cabe destacar que el antígeno P es más conservado que el antígeno F, lo que permite detectar cepas de VRS que presenten diferentes serotipos.

Otros documentos describen anticuerpos dirigidos a la proteína P del VRS humano. Por ejemplo, Orvell et al describen el uso de anticuerpos contra las principales proteínas estructurales (proteínas G, F, M, NP y P) de los virus respiratorios sinciciales (VRS) humanos (Orvell et al, J Gen Virol. 1987 68, 3125- 35) El documento US2013266600 proporciona VRS recombinante que tiene un fenotipo atenuado y que comprende una o más mutaciones en las proteínas virales P, M2-1 y/o M2-2.

El documento US2010278813A1 divulga un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se une a la proteína P del VRS. Sin embargo, ninguno de estos anticuerpos está habilitado para mejorar la sensibilidad para el diagnóstico/detección de VRS

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal contra el Virus Respiratorio Sincicial humano (VRSh). Concretamente, la presente invención involucra un anticuerpo monoclonal murino, correspondiente a un anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma denominado 2E6/D2, y que reacciona contra el antígeno P de VRSh. Dicho anticuerpo monoclonal puede ser utilizado para ensayos de detección, diagnóstico y/o determinación de infección por VRSh. Este anticuerpo puede ser utilizados simultáneamente para incrementar la sensibilidad de detección en muestras clínicas, donde existe baja disponibilidad del antígeno. En particular, el anticuerpo proveniente del hibridoma 2E6/D2 es capaz de capturar eficientemente la proteína P de VRSh en muestras clínicas.

La invención proporciona métodos de diagnóstico ex vivo o in vitro para detección del antígeno viral P de VRSh, en los cuales se utiliza el anticuerpo monoclonal producido y secretado por el hibridoma 2E6/D2 en ensayos como ELISA, microscopía de fluorescencia, inmunoblot, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, citometría de flujo, clasificador celular, inmunoprecipitación y/o Western blot. Las muestras a analizar se seleccionan de: células in vitro infectadas con VRSh, secreciones nasales, lavados nasales, secreciones faríngeas y/o lavados o secreciones bronquiales, líquido cefalorraquídeo, plasma, entre otras. La invención proporciona un método de detección de VRSh en muestras biológicas y cultivos celulares, utilizando el anticuerpo monoclonal producido y/o secretado por la línea celular del hibridoma antes mencionado, acoplado en cualquier tipo de soporte sólido, como nitrocelulosa, membrana de nylon, esferas magnéticas, esferas fluorescentes u otro soporte; o acoplado a cualquier otra molécula, como enzimas, proteínas, fluoróforos, isótopos radiactivos o cualquier otro compuesto químico. El invento puede ser usado en kits de detección para VRSh, que comprenda el anticuerpo producido por el hibridoma mencionado. Además la presente invención comprende dentro de su alcance incorporar cualquier tipo de molécula o sustrato unido químicamente, tales como marcadores, fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales, enzimas y/o cualquier elemento químico acoplado al anticuerpo monoclonal secretado por el hibridomas 2E6/D2, donde dicha molécula o sustrato unido químicamente permite visualizar o detectar al anticuerpo. De esta manera la invención también provee anticuerpos que reconocen específicamente la proteína P acoplada a moléculas o sustratos o

marcadores diferentes del anticuerpo, como parte del método de detección, análisis y/o diagnóstico en muestras biológicas.

Descripción de las figuras

Figura 1: Detección de proteína P de VRSh por el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 2E6/D2, mediante un ensayo de ELISA indirecto. La placa fue activada con 50 ng de proteína P de VRSh recombinante purificada, o con 1×10^6 ufp de VRSh. Como controles negativos, se activaron otros pocillos con 1×10^6 ufp de Metapneumovirus (hMPV) o con 50 ng de proteína BSA; además se incluyeron pocillos control sin antígeno, con anticuerpo primario, con anti-IgG de ratón conjugado con HRP (sin activar) y pocillos sin antígeno ni anticuerpo primario, solo con anticuerpos anti-IgG de ratón (HRP). Posteriormente, los pocillos se incubaron con el anticuerpo anti-P proveniente del hibridoma 2E6/D2, en cantidad de 170 ng por pocillo (A), y el anti-P RSVH102 Anti-Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein antibody, número de catálogo #AB94965 (Abcam) utilizado en cantidad de 170 ng por pocillo (B). Los datos mostrados en el gráfico expresan la absorbancia detectada a 450 nm, emitida por la conversión del sustrato Tetrametilbenzidina a un compuesto coloreado, catalizada por la enzima Horseradish peroxidase (HRP) presente en un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón que se unió específicamente a los anticuerpos secretados por el hibridoma 2E6/D2, y RSVH102 de Abcam. Los valores corresponden al promedio +/- la desviación estándar de la absorbancia emitida por cada muestra en al menos dos experimentos independientes. *** $P < 0,0001$ por la prueba de ANOVA de una vía comparado al control negativo y comprobación mediante comparaciones múltiples de Dunnett's; ns, no hay diferencia significativa comparado con el control negativo.

Figura 2: Determinación de sensibilidad de anticuerpo monoclonal producidos por el hibridoma 2E6/D2 en la detección de la proteína P de VRSh. Placas de ELISA se activaron con diluciones seriadas 1:2, iniciando con 50 ng de proteína P y finalizando con 0,04 ng (A) y diluciones seriadas 1:2 partiendo de un inóculo 1×10^5 ufp de VRSh hasta la dilución 1:5.120 (B). Se incluyeron pocillos sin activar como control negativo. Los datos mostrados en el gráfico expresan la absorbancia a 450 nm emitida por la enzima Horseradish peroxidase (HRP) presente en los anticuerpos anti-P provenientes del hibridoma 2E6/D2, que fue usado en cantidad de 170 ng/pocillo (A y B). El anti-P RSVH102 de VRSh, número catálogo #AB94965, de Abcam, también fue utilizado a una concentración de 170 ng/pocillo (A y B). Los valores corresponden al promedio de la absorbancia emitida por cada muestra, en al menos dos experimentos independientes.

Figura 3: Ensayo de diluciones seriadas del anticuerpo monoclonal anti-P de VRSh producido por el hibridoma 2E6/D2, para la detección de antígenos purificados de VRSh. Se activaron placas de ELISA con 50 ng de proteína recombinante P de VRSh y se detectó el antígeno con diluciones seriadas 1:2 del anticuerpo anti-P 2E6/D1, partiendo de una concentración de 3,4 $\mu\text{g/ml}$ (170 ng/pocillo). Los datos se expresan como el promedio del valor de la absorbancia emitida a 450 nm de cada muestra en duplicado, en al menos dos experimentos independientes.

Figura 4: Confirmación de especificidad de anticuerpo monoclonal secretado por el hibridomas 2E6/D2, mediante dot blot. El anticuerpo anti-P de VRSh producido por el hibridomas 2E6/D2 se incubó por 1 hora con una membrana de nitrocelulosa que contenía las siguientes muestras inmovilizadas (en forma de manchas o "dots"): hMPV (1×10^6 UFP), VRSh (1×10^6 UFP), BSA (1 μg), proteína P de VRSh (1 μg , 500 ng y 50 ng), y 20 μg de extracto de células HEP-2 sin infectar o infectadas con VRSh. Tras la incubación, la membrana se lavó y se incubó por 1 hora con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con la proteína HRP. Tras la incubación, la visualización de la unión del anticuerpo monoclonal al antígeno se realizó mediante la captura de la quimioluminiscencia producida por la catálisis del sustrato comercial "enhanced chemiluminescence Western blot detection system" (ECL, Amersham, Uppsala, Suecia). Se observa que el anticuerpo producido por el hibridoma 2E6/D2 se une sólo a los dots donde se encuentra presente la proteína P de VRSh, el virus VRSh y células infectadas con VRSh, confirmando la especificidad de estos anticuerpos.

Figura 5: Detección de la proteína P-VRSh por inmunofluorescencia en células HEP-2 infectadas con VRSh. Células HEP-2 fueron cultivadas in vitro hasta alcanzar confluencia (entre 70-90%), para ser infectadas por 48 horas con VRSh. Posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído y preparadas para inmunofluorescencia indirecta. Para ello se utilizó como anticuerpo primario monoclonal derivado del hibridoma 2E6/D2, del anticuerpo anti-P RSVH102, número catálogo #AB94965, de Abcam. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo comercial anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488, que emite fluorescencia a 519 nm (señal intensa). Los núcleos de las células se tiñeron con el fluoróforo TOPRO-3 iodide, que emite fluorescencia a 661 nm (círculos gris claros observados en células no infectadas y células infectadas). Se observa una fuerte reactividad en el citoplasma (señal blanca intensa, indicada con flechas blancas) solo en células infectadas cuando se utiliza cualquiera de los tres anticuerpos primarios.

Figura 6: Detección de VRSh en muestras clínicas mediante ELISA en sándwich, utilizando la combinación de anticuerpos monoclonales secretados por el hibridoma 2E6/D y el anticuerpo RSVH102, número catálogo #AB94965, de Abcam. Placas de ELISA fueron activadas con 170 ng de anticuerpo secretado por el hibridoma 2E6/D2 (A) o el anticuerpo anti-P RSVH102, número catálogo #AB94965, de Abcam (B), funcionando como anticuerpo de captura. Los pocillos activados con el anticuerpo de captura se incubaron con 50 μl de muestras de hisopado nasofaríngeo (HNF) de pacientes que presentaban cuadros respiratorios virales. Como controles negativos se analizaron 10 (A) y 3 (B) muestras de pacientes sanos. Se utilizaron 20 (A) y 5 (B) muestras de pacientes positivos para VRSh y, como

control de especificidad, se incluyeron 20 (A) y 5 (B) muestras de pacientes positivos para el Metapneumovirus. Como control positivo se incluyeron pocillos a los que se añadió proteína P de VRSh purificada. Para la detección de la proteína capturada por el anticuerpo 2E6/D2 o el anticuerpo comercial anti-P RSVH102, se utilizaron los anticuerpos producidos por el hibridoma 2E6/D2 (B), conjugado a la enzima Horseradish Peroxidase, en una dilución 1:2.000 (75 ng por pocillo). Los datos mostrados son el promedio $\pm$ la desviación estándar del valor de la absorbancia emitida a 450 nm de cada muestra (*P <0,05; ** P <0,001; ***P <0,0001 y ns no hay diferencia significativa; mediante la prueba de ANOVA de una vía comparados con pacientes positivos a hMPV o pacientes sanos).

Descripción detallada de la invención

- 10 La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmentos del mismo, el 2E6/D2 del isotipo IgG1, que reconoce específicamente la proteína P (también aquí denominado como anticuerpo anti-P), del VRSh.

La presente invención describe un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la proteína P de VRSh. Como ya se indicó, este anticuerpo el producido por los hibridomas 2E6/D2. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ambas cadenas del anticuerpo producido por el hibridoma 2E6/D2 se describen en las SEQ ID No: 1 para la cadena pesada y SEQ ID No: 2 para la cadena liviana. Las secuencias nucleotídicas que las codifican están descritas en las SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4, respectivamente.

- 15 En una realización específica de la invención, dicho anticuerpo o fragmento del mismo están conjugados con un marcador que permite su detección, tales como, biotina, metales, enzimas, proteínas, fluoróforos, isótopos radiactivos o cualquier otro compuesto químico.
- 20 En otra realización específica de la invención, dicho anticuerpo o fragmentos del mismo es un anticuerpo murino o humanizado.

Como se muestra en las figuras, este anticuerpo no reacciona con otras proteínas o moléculas presentes en virus relacionados o muestras de pacientes con otros virus asociados a infecciones respiratorias. Esto disminuye notablemente la posibilidad de falsos negativos al utilizarlos en métodos de diagnóstico.

- 25 La invención también proporciona métodos de diagnóstico ex vivo o in vitro y detección del antígeno viral P de VRSh en una muestra biológica, en los cuales se utiliza el anticuerpo monoclonal producido y secretado por el hibridoma 2E6/D2 en ensayos de detección de unión del anticuerpo con el antígeno.

- 30 El método comprende poner en contacto una muestra biológica seleccionada de: células *in vitro* infectadas con VRSh, secreciones nasales, lavados nasales, secreciones faríngeas y/o lavados o secreciones bronquiales, entre otras, con el anticuerpo monoclonal contra VRSh o un fragmento de él secretados por el hibridoma 2E6/D2, y luego detectar la unión del anticuerpo con el antígeno con un ensayo seleccionado de: ELISA, microscopía de fluorescencia, inmunoblot, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, citometría de flujo, clasificador celular, inmunoprecipitación y/o Western blot. Además el método de la presente invención comprende un anticuerpo o fragmento del mismo producido y/o secretado por las líneas celulares del hibridoma antes mencionados,
- 35 acoplado con cualquier tipo de soporte sólido, como nitrocelulosa, membrana de nylon, esferas magnéticas, esferas fluorescentes u otro soporte. En otra realización específica de la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo usado en el método están conjugados con un marcador que permite su detección, tales como biotina, metales, enzimas, proteínas, fluoróforos, isótopos radiactivos o cualquier otro compuesto químico.

- 40 La invención también describe un kit de detección para VRSh, que comprende al menos un anticuerpo producido por el hibridoma mencionado. En una realización específica de la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo producido y/o secretado por la línea celular del hibridomas antes mencionado utilizado en dichos kits, está acoplado con cualquier tipo de soporte sólido, como nitrocelulosa, membrana de nylon, esferas magnéticas, esferas fluorescentes u otro soporte. Además, en una realización específica de la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo usado en el kit está conjugado con un marcador que permite su detección, tales como biotina, metales,
- 45 enzimas, proteínas, fluoróforos, isótopos radiactivos o cualquier otro compuesto químico.

- En otra realización específica de la invención, el kit de diagnóstico corresponde a una prueba inmunocromatográfica, lumínex, citometría de flujo, inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis, Western blot, Dot plot, ELISA, inmunodifusión o inmunoprecipitación. De esta manera la invención también provee anticuerpos que reconocen específicamente la proteína P acoplada a moléculas o sustratos o marcadores diferentes del anticuerpo, como parte del método de
- 50 detección, análisis y/o diagnóstico en muestras biológicas.

A continuación se describen ejemplos que permiten demostrar las distintas aplicaciones del anticuerpo monoclonal de la invención.

Ejemplos de aplicación

Ejemplo 1: Obtención de la proteína P de VRS purificada.

Para obtener la proteína P de VRS purificada, se realizó una estrategia de expresión de forma heteróloga (recombinante) en la bacteria *Escherichia coli* BL21. Para esto, se extrajo el ARN de cultivos de células HEp-2 infectadas con VRS y el gen que codifica para la proteína P fue amplificado por PCR y clonado en un vector de expresión bacteriano (pET15b), el cual permitió controlar la expresión del gen clonado mediante la molécula inductora Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Como estrategia de purificación para las proteínas recombinantes, el vector de expresión utilizado posee un inserto que codifica para seis Histidinas consecutivas, de modo que cuando se indujo la sobre-expresión de las proteínas, estas expresaron en su extremo carboxilo terminal las 6 His consecutivas. La ventaja de utilizar dicha estrategia es que, la proteína adquiere una carga eléctrica característica, lo que permitió su purificación a través de cromatografía de afinidad a un pH adecuado. La purificación de las proteínas recombinantes con colas de histidina se logró por elusión con una solución tampón que contiene imidazol, análogo a la histidina, que compite con las proteínas por los sitios de unión en una columna de resina cargada con Ni⁺. Finalmente, las muestras purificadas se analizaron mediante geles de SDS-PAGE.

Ejemplo 2. Producción de hibridomas, producto de la fusión de un clon de linfocito B y una célula plasmática tumoral.

La producción de hibridomas se realizó mediante la inmunización de ratones BALB/c con 1 mg de antígeno (proteína recombinante purificada P de VRSh emulsionada en adyuvante de Freund), con una pureza mayor al 50%. Después de la inmunización, se seleccionó el ratón que presentaba el título más alto de anticuerpos en el suero, y se le dio otra inyección de refuerzo. Tres días después se aislaron sus linfocitos esplénicos para hacer una fusión somática con células de la línea celular mieloide NSO/2 no secretora. Los hibridomas producidos se sembraron en placas de 96 pocillos en un medio selectivo que contiene Hipoxantina, Aminopterina y Timidina (HAT). Después de 10 días el sobrenadante de los hibridomas viables se evaluó por ELISA para detectar anticuerpos contra el antígeno utilizado para inmunizar. Los hibridomas positivos se expandieron a placas de 24 pocillos para generar un volumen mayor de sobrenadantes, que posteriormente se utilizaron para realizar ensayos de caracterización (especificidad, sensibilidad, eficiencia). Finalmente los hibridomas con mayor especificidad fueron clonados por dilución límite, es decir, se realizaron diluciones sucesivas de una suspensión celular, hasta conseguir una alícuota que contenía una sola célula. Posteriormente, se prepararon líquidos ascíticos en ratones y se determinó la subclase de cada anticuerpo monoclonal. La concentración de los anticuerpos monoclonales generados se determinó por ELISA, incubando los anticuerpos en diferentes concentraciones y usando un anticuerpo monoclonal anti-Melan A (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) de ratón para preparar la curva estándar.

Ejemplo 3: Determinación de la secuencia nucleotídica que codifica las cadenas livianas (VL) y pesadas (VH) de la región variable del anticuerpo anti-P VRSh secretado por el hibridoma 2E6/D2.

El siguiente protocolo fue utilizado para el hibridoma 2E6/D2. Se cultivó el hibridoma en medio de cultivo DMEM-high glucose suplementado con 3,7 g/L de Bicarbonato de Sodio y 10% de suero fetal bovino, a 37°C con 10% CO₂, hasta una densidad celular de 700.000 células/ml. Se obtuvo el RNA total de 3,5 x10⁶ células, realizando un tratamiento con el compuesto Trizol (Invitrogen). Se utilizó 0,5 μ g de RNA para generar el cDNA mediante reacción de retrotranscripción con el kit Impron II (Promega). Mediante PCR se amplificó la región variable de los genes que codifican las cadenas kappa y lambda de las inmunoglobulinas. Para esto se utilizaron los cebadores universales del kit Ig Primer set de Novagen (n° catálogo 69831-3) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

La región variable de la cadena liviana se amplificó con los cebadores MulgVL5'-B: 5'ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACTSCTGYTATGGGT3' (SEQ ID NO: 10) y la cadena pesada se amplificó con los cebadores MulgVH5'-A: 5'GGGAATTCATGRASTTSKGGYTMARCTKGRITTT3' (SEQ ID NO: 11) y MulgVH5'- F: 5'ACTAGTCGACATGAACCTTYGGGYTSAGMTTGRTTT3' (SEQ ID NO: 12). Los productos de PCR fueron clonados en el vector de clonamiento pTOPO-TA (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y secuenciado por el servicio de secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile en un secuenciador ABI prism 3130xl (Applied Biosystem). Las secuencias de aminoácidos deducidas (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el hibridoma 2E6/D2 se obtuvieron utilizando el programa bioinformático Vector NTI (Invitrogen).

Ejemplo 4: Ensayo de detección de antígenos VRSh, determinación de especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-P VRSh para antígenos purificados de VRSh mediante ensayo de ELISA indirecto.

Este ensayo tiene como objetivo demostrar la especificidad por la proteína P de VRSh del anticuerpo producido por el hibridoma 2E6/D2. La detección del antígeno se llevó a cabo mediante la técnica de ELISA indirecto, donde la placa de ELISA se activó con 50 ng de antígeno purificado por 1 hora a 37°C. De igual manera se activó la placa con 1x10⁶ unidades formadoras de placas (ufp) del VRSh. Como controles negativos se incluyó Metapneumovirus (hMPV) bajo las mismas condiciones en que se incubó el VRSh, y además se incluyeron 50 ng de proteína de BSA en un pocillo independiente. Posteriormente, la placa se lavó dos veces con regulador fosfato salino (PBS) /Tween 0,05%. Luego la placa se bloqueó por 2 horas a 37° C con PBS /FBS 10%. Posteriormente se repitieron los lavados y a continuación se incubó el anticuerpo producido por el hibridoma 2E6/D2 a una concentración final de 3,4 μ g/ml, diluido en PBS/FBS 10%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Bajo las mismas condiciones, en una placa diferente, se realizó un ensayo control utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína P de VRSh

(Anti-Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein antibody RSVH102, número de catálogo #AB94965, Abcam) a una concentración de 3,4 µg/ml. Transcurrido el tiempo de incubación, se repitieron los lavados y se agregó a cada uno de los pocillos un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con la enzima peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase, HRP) en dilución 1 en 2.000 (25 ng por pocillo) en PBS/FBS 10%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron los lavados y se reveló con 50 µl de regulador citrato/Tetrametilbenzidina (TMB, 3-3'-5-5'-tetramethylbenzidine, 1mg/ml, Becton Dickinson). Para detener la reacción se adicionaron 50 µl de H₂SO₄ 2N y el resultado se leyó en un lector de ELISA, a 450nm. Para determinar que la reacción del anticuerpo secundario era específica en reconocer al anticuerpo primario y además que la señal obtenida no sea provocada por unión inespecífica del anticuerpo secundario al antígeno viral, se realizaron controles en los cuales se utilizó solamente el anticuerpo secundario sin anticuerpo primario ni muestra (pocillo sin activar). Otro control para determinar que la reacción del anticuerpo primario es específica para el antígeno, consistió en el uso de los anticuerpos sobre una placa de ELISA que no ha sido activada con el antígeno (sin antígeno) o usando los anticuerpos sobre una placa de ELISA que poseía 50 ng de la proteína BSA o un virus diferente (hMPV). Los resultados muestran que el anticuerpo monoclonal de la invención es capaz de reconocer 50 ng de antígeno purificado, de manera específica, ya que no reconocen la proteína BSA, ni proteínas de otro virus relacionado (Figura 1A). Por otro lado se observó que el anticuerpo comercial RSVH102 (Figura 1B) utilizado en el ensayo como control, fue específico para la detección tanto del virus como de la proteína P de VRSh recombinante.

Ejemplo 5: Ensayo para determinar la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos virales.

El ensayo se realizó para determinar la máxima dilución de proteína y virus que el anticuerpo monoclonal anti-P de VRSh provenientes del hibridoma 2E6/D2 es capaz de detectar mediante ELISA indirecto. Para esto, se ocupó la misma técnica descrita en el ejemplo 4. Se activó la placa con 11 diluciones seriadas 1:2 de proteína P de VRSh, partiendo con 50 ng de antígeno purificado. Respecto al virus, se activó la placa con diluciones seriadas de 1:2, a partir de 1x10⁵ ufp de virus. El anticuerpo anti-P 2E6/D2, se utilizó en una concentración de 3,4 µg/ml (170 ng/pocillo), diluido en PBS/FBS 10%. Posteriormente se adicionó el anticuerpo de detección anti-IgG de ratón en una dilución de 1:2.000 (25 ng/pocillo). Los resultados mostraron que el anticuerpo anti-P 2E6/D2 es capaz de reconocer hasta 40 picogramos (pg) de la proteína P de VRSh (Figura 2A). El anticuerpo anti-P RSVH102, #AB94965 de Abcam, también fue capaz de reconocer todas las diluciones de la proteína P de VRSh.

En cuanto a la sensibilidad del anticuerpo representada en su capacidad de detectar el VRSh en altas diluciones, se pudo observar que el anticuerpo anti-P proveniente del hibridoma 2E6/D2 pueden detectar todas las diluciones realizadas del virus, lo que sería equivalente a unas 390 partículas virales aproximadamente. El anticuerpo monoclonal es más eficiente que el anticuerpo comercial anti-P de VRSh, el cual detecta hasta una dilución 1:40 (Figura 2B).

Se incluyeron en todos los ensayos controles que permitieran descartar reacciones inespecíficas de los anticuerpos, los cuales contenían todos los componentes del ensayo, exceptuando la muestra (proteína P VRSh o virus).

Ejemplo 6: Ensayo para determinar la eficiencia del anticuerpo monoclonal para detectar antígenos virales.

El ensayo se realizó para determinar la máxima dilución del anticuerpo monoclonal anti-P de VRSh proveniente del hibridoma 2E6/D2, que permite la detección del antígeno viral mediante ELISA. Para esto, se ocupó la misma técnica de ELISA indirecto del ejemplo 6. Se activó la placa con 50 ng de antígeno purificado y el anticuerpo anti-P 2E6/D2 se utilizó en diluciones 1:2, partiendo de la concentración de trabajo (3,4 µg/ml) hasta la dilución 11 en PBS/FBS 10%. En la **Figura 3** se observa que a todas las diluciones que se utilizaron en el ensayo, el anticuerpo anti-P 2E6/D2 es capaz de detectar la proteína P de VRSh. El anticuerpo anti-P RSVH102, número catálogo #AB94965, de Abcam, también fue capaz de detectar en todas las diluciones la proteína P de VRSh.

El control negativo incluido en este ensayo corresponde a un pocillo que no contiene muestra (proteína P), fue bloqueado con PBS/FBS 10%, no se le adicionó anticuerpo primario (anti-P 2E6/D2) y sólo contiene anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP.

Ejemplo 7: Diagnóstico clínico de muestras de pacientes infectados con VRSh, utilizando anticuerpo monoclonal anti-P VRSh mediante la técnica de ELISA en Sándwich.

Debido a que la disponibilidad y concentración de las proteínas virales en muestras clínicas obtenidas de hisopados nasofaríngeos es baja, fue necesario modificar el método de detección y utilizar el método de ELISA en sándwich, usando como anticuerpo de captura el anticuerpo anti-P proveniente del hibridoma 2E6/D2 o el anticuerpo anti-P de VRSh RSVH102, número catálogo #AB94965, de Abcam. Para el ensayo se activaron pocillos de una placa de ELISA con 3,4 µg/ml (170 ng /pocillo) del anticuerpo anti-P proveniente del hibridoma 2E6/D2, número catálogo #AB94965, de Abcam, diluido en PBS, durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 2 lavados con PBS-Tween20 al 0,05% y posteriormente se bloqueó la placa con 200 µL de PBS/FBS al 10% durante 2 horas a 37°C. Se lavó nuevamente y se incubó toda la noche a 4°C cada pocillo con 50 µL de aspirados nasofaríngeos de pacientes positivos para VRSh de acuerdo al método de diagnóstico "D³ Ultra DFA Respiratory Virus Screening and ID Kit de DHI (Diagnostics Hibryds) USA", denominado de manera rutinaria como "panel viral", y que fueron tratadas como se describe

posteriormente*. Como controles se incluyeron: 1) control de especificidad (50 µL de muestra de pacientes diagnosticados con hMPV mediante el panel viral), 2) control positivo (50 ng de proteína P VRSh recombinante) y 3) Control negativo correspondiente a muestras de pacientes sanos (negativos para virus mediante el panel viral). Al día siguiente se realizaron los lavados y cada pocillo se incubó por 1 hora a 25°C con 50 µL del anticuerpo anti-P proveniente del hibridoma 2E6/D2 conjugado con HRP. Se lavó la placa 2 veces más y se reveló con 50 µL de solución TMB, se incubó de 10 a 15 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µL de H₂SO₄ 2N. La lectura de la placa se realizó en un lector de ELISA Epoch, certificado para diagnóstico clínico. Los resultados obtenidos para este ensayo se muestran en la Figura 6, donde se puede observar que la técnica de ELISA en sándwich utilizando el anticuerpo proveniente del hibridoma 2E6/D2 como anticuerpo de captura, permite detectar el antígeno en muestras de pacientes infectados con VRSh (Figura 6A), los cuales fueron previamente confirmados por Inmunofluorescencia directa en un laboratorio clínico certificado, utilizando el panel viral. El número de pacientes incluidos en el ensayo fue de 20, de los cuales 17 fueron detectados como positivo por ELISA con una densidad óptica (OD) por encima de 0,1. En la figura 6B se muestran los resultados obtenidos con el anticuerpo comercial de captura y el clon anti-P 2E6/D2 de anticuerpo de detección. Los resultados muestran que de un total de 5 pacientes positivos para VRSh, sólo 1 fue detectado en ELISA en Sándwich, tanto para la combinación del anticuerpo anti-P de VRSh RSVH102, número catálogo #AB94965, de Abcam de captura con el clon el clon 2E6/D2. Estos resultados muestran la alta eficiencia del anticuerpo monoclonal de la invención en la detección del virus en muestras clínicas en comparación al anticuerpo anti-P de VRSh RSVH102, número catálogo #AB94965, de Abcam.

*: Tratamiento de muestras clínicas. Las muestras que se utilizaron para los ensayos fueron obtenidas a partir de hisopados nasofaríngeos contenidos en medio de transporte universal. Se centrifugaron las muestras a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se separó el sobrenadante (SN1) de la pella; este último fue incubado con 100 µL de Regulador RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Deoxicolato de Sodio, 0,1%, SDS en un cóctel de inhibidores de proteasas) durante 15 minutos a 4°C, agitando por vórtex cada 5 minutos. A continuación se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Al finalizar se tomó el sobrenadante obtenido (SN2) y se mezcló con el SN1.

Ejemplo 8: Ensayo de especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-P VRSh para antígenos purificados de VRSh, mediante el ensayo de Dot-Blot.

Este ensayo tiene como objetivo confirmar la especificidad por la proteína P de VRSh del anticuerpo producido por el hibridoma 2E6/D2, utilizando la metodología de inmunoblot. La detección del antígeno se llevó a cabo mediante la técnica de dot-blot, donde una membrana de nitrocelulosa es utilizada como soporte sólido para inmovilizar el antígeno presente en una gota de suspensión. Para ello, se depositó sobre la membrana de nitrocelulosa 20 µl que contenían cada una: 1x10⁶ ufp de hMPV, 1x10⁶ ufp VRSh, proteína P de VRSh purificada (1µg, 500 ng y 50 ng), 20 µg de extracto de células HEp-2 infectadas con VRSh y 20 µg de extracto de células HEp-2 sin infectar. Como control negativo se aplicaron 500 ng de BSA, contenidos en 20 µl. Se permitió que las soluciones aplicadas sobre la membrana secaran al aire por 15 minutos. Posteriormente, la membrana se bloqueó con BSA al 5% en PBS conteniendo Tween-20 0,05%, por 1 h a 25° C. Las membranas fueron incubadas con 3,4 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-P proveniente del hibridoma 2E6/D2 en solución de bloqueo por 1 h a 25° C. Luego se retiró el exceso de anticuerpo no adherido al antígeno mediante tres lavados con PBS-Tween-20 0,05% a 25° C. La detección de los anticuerpos unidos al antígeno se realizó mediante un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP (Invitrogen, Life Technologies #62-6520). Este se incubó durante 1 h en solución de bloqueo a 25° C, para posteriormente eliminar el exceso de anticuerpo no unido mediante tres lavados con PBS-Tween-20 0,05% a 25° C. La visualización de la unión del anticuerpo monoclonal al antígeno se realizó mediante la captura de la quimioluminiscencia producida por la catálisis de sustrato comercial "enhanced chemiluminescence Western blot detection system" (ECL, Amersham, Uppsala, Suecia), mediado por la enzima HRP unida al anticuerpo anti-IgG de ratón. La captura de la quimioluminiscencia se realizó en el fotodocumentación MyECL (Thermo Fisher). Como se observa en la Figura 4, el anticuerpo proveniente del hibridoma 2E6/D2 sólo se une a los "dots" que contienen VRSh o proteína P, y no se une de manera inespecífica a los "dots" que contienen proteínas no relacionadas, otros virus o células no infectadas.

Ejemplo 9: Detección de infección por VRSh en células HEp-2 mediante Inmunofluorescencia, utilizando anticuerpo monoclonal anti-P VRSh.

Este ensayo fue realizado para ampliar el espectro de técnicas que permiten detectar infección por VRSh, utilizando la invención descrita. Se llevó a cabo un ensayo por microscopia de fluorescencia, donde células HEp-2 infectadas o sin infectar con VRSh fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-P de VRSh derivado del hibridoma 2E6/D2. El protocolo utilizado fue el siguiente: las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% diluido en PBS, durante 10 minutos a 25° C. Luego, las células fueron lavadas con PBS y se permeabilizaron con saponina 0,2% diluida en PBS/FBS 10% por 30 minutos a 25° C. Se adicionó el anticuerpo monoclonal derivado del hibridoma 2E6/D2 a una concentración de 3,4 µg/ml, diluido en PBS/FBS 10% durante 1 hora a 25° C. Se realizaron posteriormente dos lavados con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa fluor 488 (Life Technologies), en dilución 1 en 200 en PBS/FBS 10% durante 1 hora a 25° C, en oscuridad. Se repitieron los lavados y se tiñeron los núcleos con TOPRO-3 iodide 642/661 (Invitrogen, #T3605) a una dilución 1:5.000 durante 15 minutos a 25° C, en oscuridad. Por último se lavó con PBS y se realizó el montaje de los

cubreobjeto para su posterior observación en un microscopio de epifluorescencia. Los resultados obtenidos muestran que el anticuerpo constituyente de la invención también es útil para reconocer específicamente células infectadas mediante inmunofluorescencia, sin unirse de manera inespecífica a células no infectadas (Figura 5).

- 5 Los ejemplos descritos en esta memoria descriptiva demuestran la especificidad, eficiencia, sensibilidad y versatilidad que tiene este anticuerpo monoclonal anti-P de VRSh secretado por las líneas celulares del hibridoma 2E6/D2. Los ejemplos aquí presentados constituyen una demostración de algunos de los usos del anticuerpo monoclonal anti-P de VRSh, pero en ningún caso limita el alcance de la presente invención.

Listado de secuencias

<110> PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE

- 10 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICAMENTE PARA EL ANTÍGENO P DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO, PRODUCIDO Y SECRETADO POR LOS HIBRIDOMAS DE LAS CÉLULAS, ÚTILES PARA LA DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR RSV

<130> W 2016/7469

<150> CL 201502152

- 15 <151> 2015-07-31

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 153

- 20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético - Hibridoma 2E6/D2 - anti-P VH

<400> 1

ES 2 784 888 T3

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Met Ala Gln Ser Gly Pro
1 5 10 15

Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
20 25 30

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
35 40 45

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Leu Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Asp Pro
65 70 75 80

Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
85 90 95

Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp
100 105 110

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
115 120 125

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Pro Ser Val Tyr Pro Leu
130 135 140

Ala Pro Gly Ser Leu Gly Ile Thr Ser
145 150

<210> 2

<211> 152

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético - Híbrido 2E6/D2 - anti-P VL

<400> 2

ES 2 784 888 T3

Met Glu Ser Asp Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
20 25 30

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser
35 40 45

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Tyr
100 105 110

Gln Gln Thr His Pro Pro Thr Gln Pro Thr Cys Asn Ser Ala Ala Trp
115 120 125

His Leu Arg Thr Leu Pro Ser Ile Thr Val Arg Ala Ala Ser Thr Cys
130 135 140

Gly His Pro Val Ser Leu Gly Ile
145 150

<210> 3

<211> 459

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético - Híbrido 2E6/D2 - anti-P VH

<400> 3

atggaatgga gctgggtcct cctcttcctg atggcacagt ctgggcctga gctggtgagg	60
cctggggcctt cagtgaagat gtcctgcaag gcttcaggct ataccttcac cagctcctgg	120
atgcactggg tgaacacagag gcctggacaa ggccttgagt ggatgaggca gaggcctgaa	180
cagggcctgg agtggcttgg gaggattgat cctgcgaatg gtaattctaa atatgaccog	240
aagttccagg gcaaggccac tataacagca gacacatcct ccaacacagc ctacctgcaa	300
ctcagcagcc tgggtagtta tacctactat ccagacagtg tgaaggggog attcaccatc	360
tccagagaca atgccaagaa ttccctatac ctgcaaatga gcagtctgag gtctccatcc	420
gtctatcccc tggcccctgg aagcttgagg atcactagt	459

10 <210> 4

<211> 456

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético - Hibridoma 2E6/D2 - anti-P VL

5 <400> 4

atggagtcag acacagacac actcctgcta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc	60
actggtgaca ttgtgctgac acagtctcct gcttccttag ctgtatctct ggggcagagg	120
gccaccatct catacagggc cagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggaac	180
caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct	240
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	300
cctgtggagg agcaactcag cagcctgaca tcttaccagc agacacatcc tccaacacag	360
cctacctgca actcagcagc ctggcatctg aggacactgc cgtctattac tgtgcgagcg	420
gcttctactt gcggacatcc agtaagcttg ggaatc	456

<210> 5

<211> 154

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético - Hibridoma 6H5/H1 - anti-P VH

<400> 5

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

ES 2 784 888 T3

35

40

45

Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
50 55 60

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser
65 70 75 80

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro
85 90 95

Gly Met Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Ala Met Ser Trp Ala
100 105 110

Arg Gln Thr Pro Glu Lys Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Pro
130 135 140

Val Tyr Ala Leu Gly Pro Trp Lys Leu Gly
145 150

<210> 6

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético - Hibridoma 6H5/H1 - anti-P VL

<400> 6

Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
1 5 10 15

Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Gly Asp Ile
20 25 30

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr
50 55 60

Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu
65 70 75 80

Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ile Arg Glu
85 90 95

ES 2 784 888 T3

Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Lys Tyr Ser Ser Ser Ile
100 105 110

Phe Pro Pro Ser Ser Lys Leu Gly Asn
115 120

<210> 7

<211> 462

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético - Híbrido 6H5/H1 - anti-P VH

<400> 7

atggaatgga gcaggcagag gcctgaacag ggcctggagt ggcttgggag gattgatcct	60
gcgaatggtta attctaaata tgacccgaag ttccaggga aggccactat aacagcagac	120
acatcctcca acacagccta ctctgcaca gcttctggct tcaacattac acagtctcct	180
gcttccttag ctgtatctct ggggcagagg gccaccatct catacagggc cagcaaaagt	240
gtcagtagcat ctggctatag ttatatgcac tggaaccaac agaaaccagg aatggcctct	300
ggattcactt tcagtcacta tgccatgtct tgggctcgcc agactccgga gaagcagcag	360
tctgggcctg agctggtgag gcctggggct tcagtgtgca ctgtctctgc agccaaaaca	420
acacccccac ccgtctatgc ccttggcccc tggaagcttg gg	462

10 <210> 8

<211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintético - Híbrido 6H5/H1 - anti-P VL

<400> 8

atggagtcag acacactgct gactggtgac attgtgctga cacagtctcc tgcttcctta	60
gctgtatctc tggggcagag ggccactggt gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc	120
ttagctgtat ctctggggca gagggccacc atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt	180
acatctggct atagttatat gcaactggaac caacagaaac caggacagcc acccagactc	240
ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct ggggtcccta ttagggagct tacacgttog	300
gaggggggac caagctggaa atattcatct tccatcttcc caccatccag taagcttggg	360
aat	363

<210> 9

<211> 33

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético – Nucleótidos de cebador MulgkVL5'-B
 <400> 9
 gggaattcat ggagacagac acactcctgc tat 33

5 <210> 10
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

10 <223> Sintético - Nucleotides of primer MulgkVL5'-C
 <400> 10
 actagtcgac atggagwcag acacactsct gytatgggt 39
 <210> 11
 <211> 33

15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético – Nucleótidos de cebador MulgVH5'-A
 <400> 11

20 gggaattcat grasttskkg ytmrctkgr ttt 33
 <210> 12
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

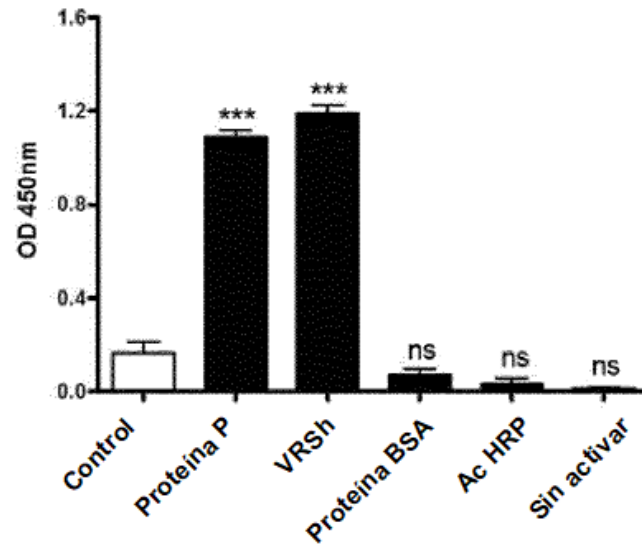
25 <220>
 <223> Sintético – Nucleótidos de cebador MulgVH5'-F
 <400> 12
 actagtcgac atgaacttyg ggytsagmtt grttt 35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se une a la proteína P del Virus Respiratorio Sincial humano (VRSh), en el que el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia SEQ ID No:1 y una región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia SEQ ID No:2.
- 10 2. Anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento además se encuentra unido a un marcador que permite su detección, seleccionado del grupo compuesto por fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales y enzimas.
- 15 3. Conjunto de secuencias nucleotídicas que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el conjunto de secuencias nucleotídicas comprende un nucleótido que tiene la secuencia SEQ ID No:3, y sus reversos complementarios, que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, y comprende un nucleótido que tiene la secuencia SEQ ID No:4, y sus reversos complementarios, que codifican la región variable de la cadena liviana del anticuerpo.
- 20 4. Un método in vitro y/o ex vivo de diagnóstico de infección por VRSh en una muestra biológica, en el que el método comprende poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo monoclonal contra la proteína P de VRSh o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 y detectar la unión del anticuerpo con el antígeno.
- 25 5. Un método in vitro y/o ex vivo de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo compuesto por células in vitro infectadas con VRSh, secreciones nasales, lavados nasales, secreciones faríngeas y/o lavados o secreciones bronquiales.
- 30 6. Un método in vitro y/o ex vivo de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en el que el ensayo utilizado para la detección de la unión del anticuerpo con el antígeno se selecciona de: ELISA, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, citometría de flujo, clasificador celular, inmunoprecipitación y/o Western blot.
- 35 7. Un método in vitro y/o ex vivo de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, se encuentra conjugado con un marcador que permite su detección.
- 40 8. Un método in vitro y/o ex vivo de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el anticuerpo se encuentra unido a un marcador seleccionado del grupo compuesto por fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales y enzimas.
- 45 9. Un método in vitro y/o ex vivo de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el anticuerpo se encuentra adosado a un soporte sólido.
- 50 10. Un método in vitro y/o ex vivo de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el soporte sólido es una membrana formada por uno de los compuestos seleccionados del grupo compuesto por nitrocelulosa, celulosa, polietileno y nylon.
- 55 11. Kit de diagnóstico para detectar VRSh, en el que el kit comprende al anticuerpo monoclonal contra VRSh de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
12. Kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el anticuerpo se encuentra adosado a un soporte sólido.
13. Kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el soporte sólido es una membrana formada por uno de los compuestos seleccionados del grupo compuesto por nitrocelulosa, celulosa, polietileno y nylon.
14. Kit de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el kit de diagnóstico corresponde a una prueba inmunocromatográfico, Luminex, citometría de flujo, inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis, Western blot, Dot plot, ELISA, inmunodifusión o inmunoprecipitación, para detectar al VRSh.

Figura 1

A



B

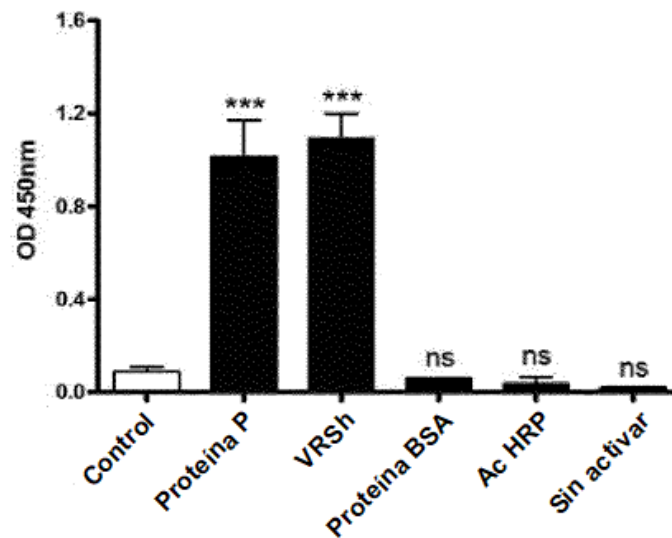
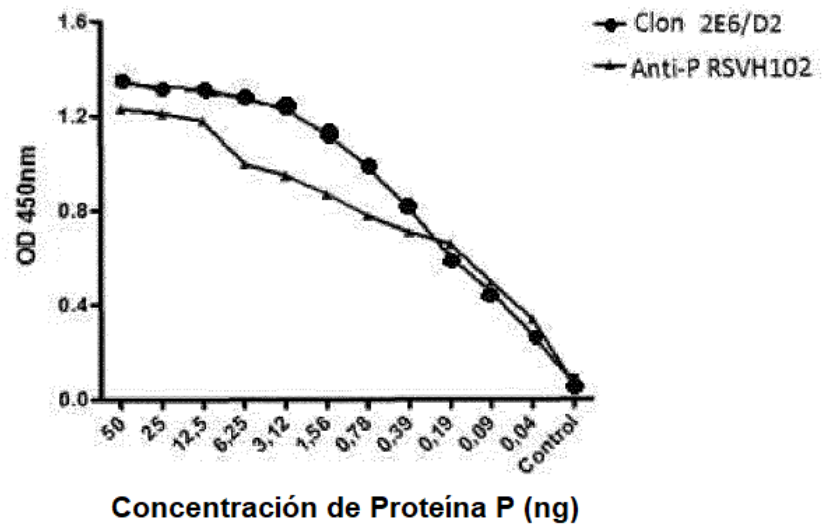


Figura 2

A



B

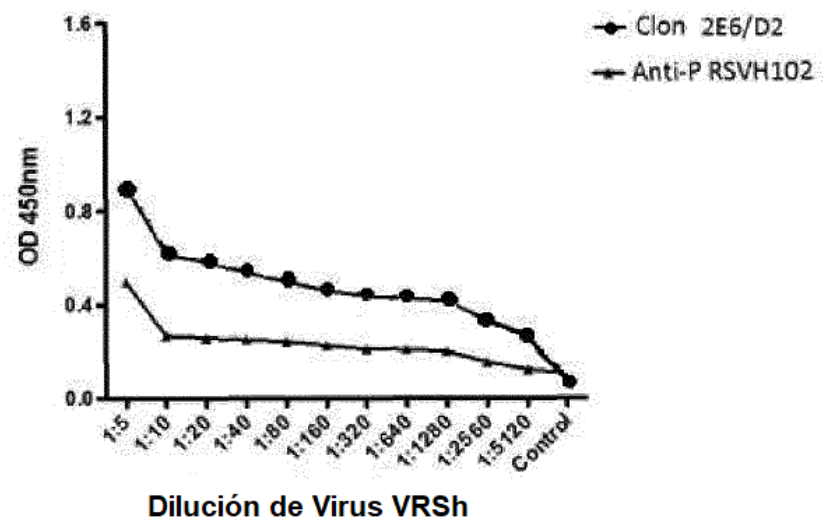


Figura 3

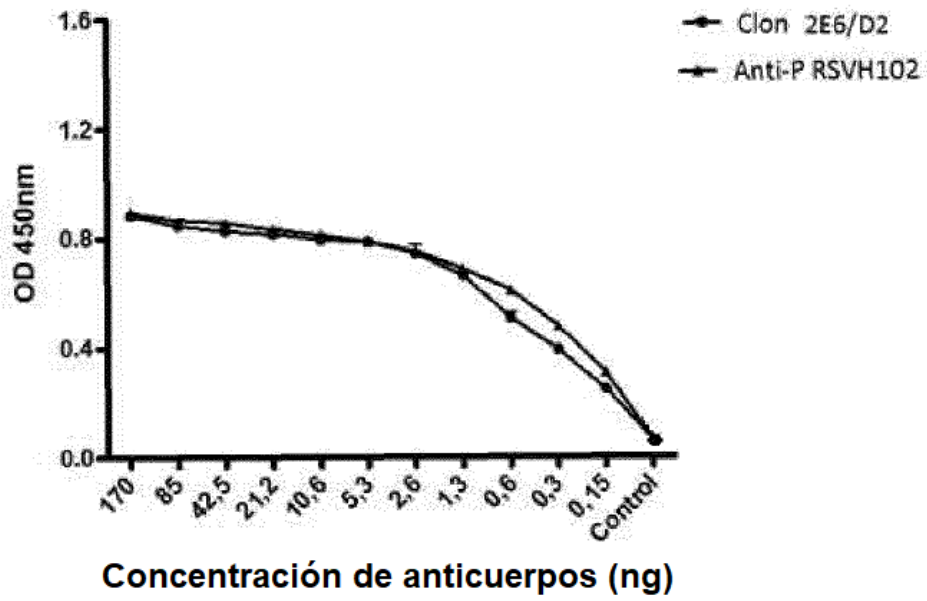


Figura 4

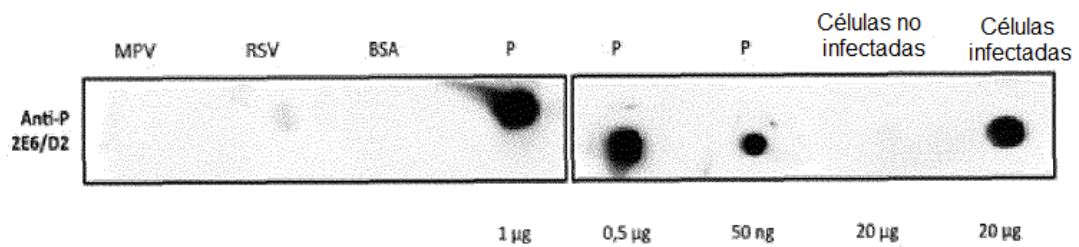


Figura 5

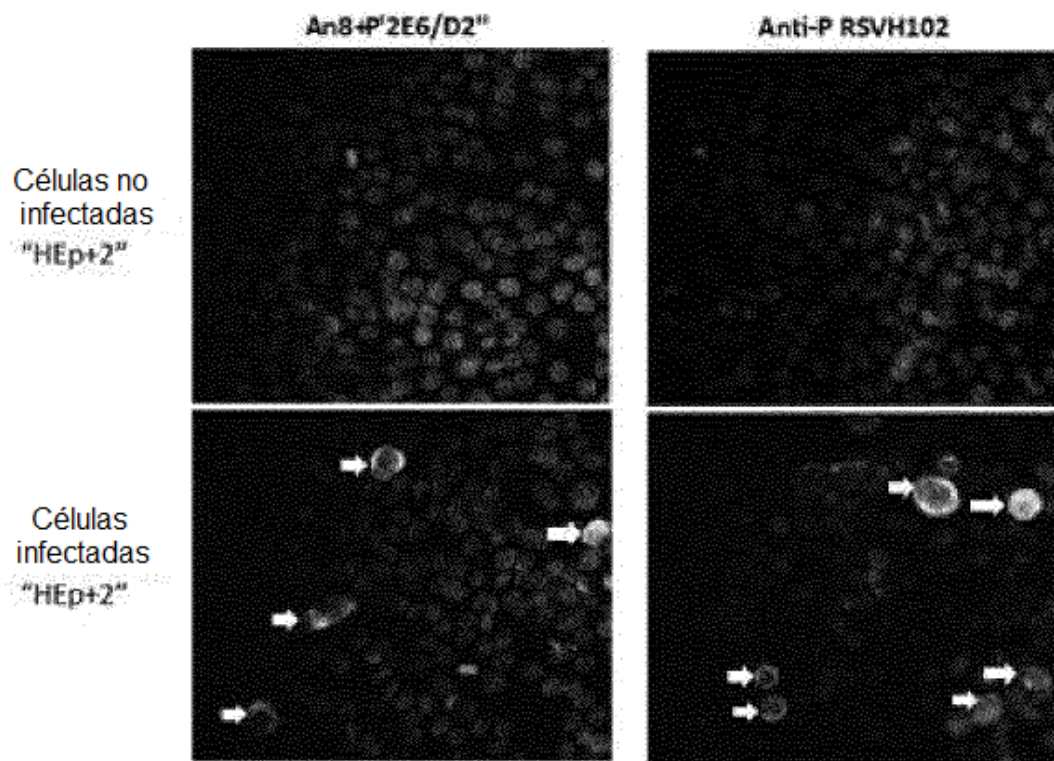
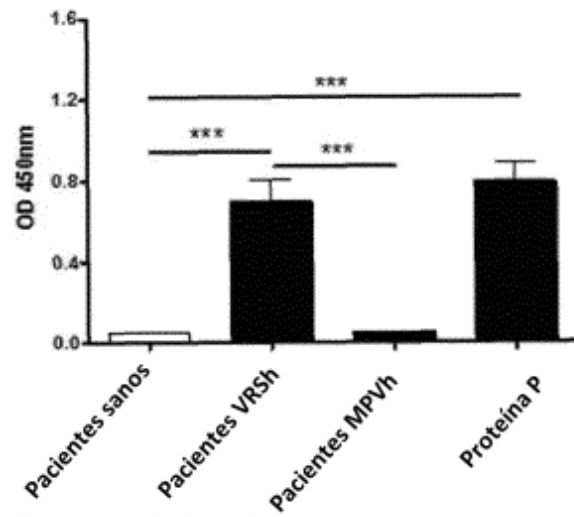
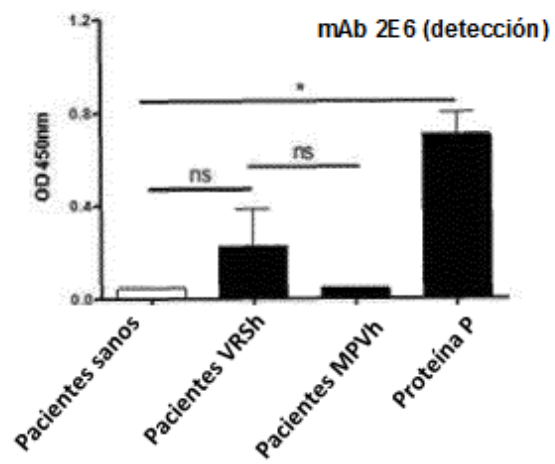


Figura 6

A



B



Anti-P RSVH102 (captura)