

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
12 de marzo de 2020 (12.03.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/047683 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

C07K 16/10 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/CL2018/050079

(22) Fecha de presentación internacional:

03 de septiembre de 2018 (03.09.2018)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(71) Solicitantes: **PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE** [CL/CL]; Av. Libertador Bernardo OHiggins, 340, Santiago, 8331150 (CL). **FUNDACION CO-**

PEC UNIVERSIDAD CATOLICA [CL/CL]; Av. Vicuña Mackena 4860, Macul, Santiago, 7820436 (CL).

(72) Inventores: **KALERGIS PARRA, Alexis**; Av. Libertador Bernardo OHiggins, 340, Santiago, 8331150 (CL). **BUENO RAMÍREZ, Susan**; Av. Libertador Bernardo OHiggins, 340, Santiago, 8331150 (CL).

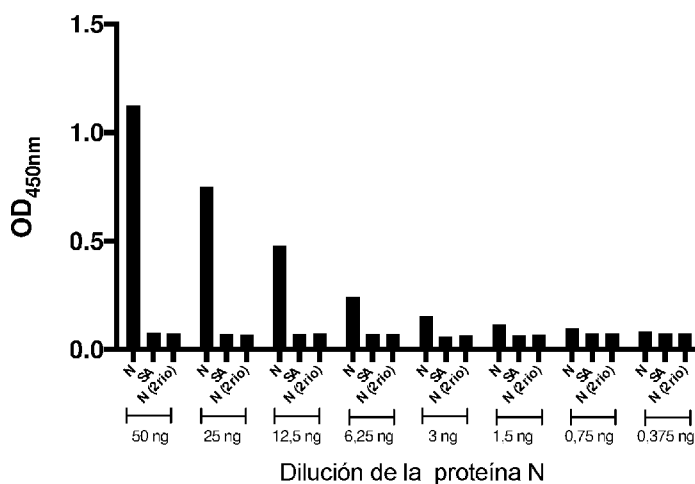
(74) Mandatario: **ALBA PROFESIONALES** et al.; Lota 2267 oficina 211, Providencia, Santiago, 8340386 (CL).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,

(54) Title: SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST THE N ANTIGEN OF HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (HRSV) USEFUL FOR TREATING INFECTION, DETECTION THEREOF AND DIAGNOSIS

(54) Título: ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECÍFICO CONTRA EL ANTÍGENO N DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO (VRS), ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN, SU DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO

FIGURA 4



AA N Protein dilution

(57) Abstract: The invention relates to a monoclonal antibody or fragment thereof that recognises the N (nucleocapsid) protein of the human respiratory syncytial virus (RSV) useful for developing methods for diagnosing RSV infection and for producing pharmaceutical compositions for the treatment, protection and/or prophylaxis of RSV infection.

(57) Resumen: La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, que reconoce la proteína N (nucleocápside) del virus respiratorio sincicial humano (VRS), útil para el desarrollo de métodos de diagnóstico de infección por VRS y para la

[Continúa en la página siguiente]

MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

- (84) Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- *sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))*
- *sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))*
- *sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))*

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*
- *en blanco y negro; la solicitud internacional se presentó en colores o en escala de grises y puede descargarse de PATENTSCOPE.*

Anticuerpo Monoclonal específico contra el antígeno N del Virus Respiratorio Sincicial Humano (VRSH), útiles para el tratamiento de la infección, su detección y diagnóstico.

MEMORIA DESCRIPTIVA

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, que reconoce la proteína N (nucleocápside) del virus respiratorio sincicial humano (VRS), útil para el desarrollo de métodos de diagnóstico de infección por VRS y para la producción de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento, protección y/o profilaxis de la infección por VRS.

Antecedentes de la Invención

Las infecciones agudas del tracto respiratorio son la principal causa de hospitalizaciones y muertes pediátricas en todo el mundo (Bryce et al., 2005). Durante los meses fríos, las infecciones del tracto respiratorio causado por virus se agudizan y producen un aumento del número de casos, situación que adquiere características de brote epidémico. Los virus causantes de estas epidemias en la población pediátrica son principalmente el virus respiratorio sincicial humano (**VRSh**), el adenovirus (**ADV**), el virus influenza y el metapneumovirus (**hMPV**). Sin embargo, el VRS es el principal agente causante de infecciones agudas del tracto respiratorio en lactantes de todo el mundo, provocando severos brotes en los meses invernales. Según la OMS, este virus infecta a 64 millones de personas anualmente, de los cuales 160.000 mueren. La infección por este virus provoca una amplia gama de cuadros clínicos, que pueden ser leves como rinitis o mucho más severos, como neumonías o bronquiolitis, observándose los cuadros más graves en niños lactantes, prematuros, niños con cardiopatías congénitas y en inmunodeprimidos (Cabalka, 2004; Carpenter y Stenmark, 2004; Weisman, 2003). Además, la infección causada por este virus es

sumamente frecuente y recurrente, ya que prácticamente el 100% de los niños mayores de tres años ha presentado por lo menos un episodio de infección por VRSh (Bont et al., 2002; Hall et al., 1991). Debido a que esta infección no deja una memoria inmunológica adecuada (Bont et al., 2002), las reinfecciones son frecuentes, disminuyendo su severidad a medida que aumenta la edad del paciente. Sin embargo, los individuos reinfectados actúan como reservorios y son fuente de contagio para niños menores de 1 año, los que sí generan cuadros respiratorios severos. En Chile, durante los meses fríos (Mayo-Agosto) este virus es el causante del 70% de la infecciones agudas del tracto respiratorio bajo que requieren hospitalización (Avendaño et al., 2003), causando la muerte del 0,1% de ellos. Aunque este porcentaje es bajo, la gran cantidad de casos hace que el número de muertes sea muy significativo. Esta situación provoca la saturación de los servicios de atención de urgencia, lo que muchas veces ha requerido la aplicación de medidas de emergencia en los servicios de salud, como la reconversión de camas para pacientes pediátricos en los hospitales, la suspensión de cirugías electivas y programadas y la contratación de personal de apoyo durante los meses en que ocurre el brote. El método de diagnóstico de VRSh que suele ser utilizado en los servicios de atención hospitalaria es un test de diagnóstico basado en la detección de antígenos virales mediante inmunofluorescencia directa de isopados nasofaríngeos. La limitación de ese test se refiere a la necesidad de personal entrenado para el procesamiento y análisis de las muestras y, además, a que los resultados de dicho test no se obtienen de forma inmediata, dejando un periodo de tiempo en el que el paciente aún no es diagnosticado, pero la infección continúa su curso. Ante tal problemática, el desarrollo de anticuerpos monoclonales eficientes, que puedan ser utilizados para la creación de test de detección de VRSh alternativos, que requieren mínimo entrenamiento y son rápidos de realizar (como por ejemplo los test inmunocromatográficos) aparecen como una alternativa necesaria para suplir dicha necesidad, puesto que permiten el reconocimiento específico de antígenos virales en muestras de pacientes infectados

con VRSh, requiriendo además una baja cantidad de muestra. De este modo, la presente invención se traduce en un anticuerpo capaz de detectar antígenos de VRSh de manera muy eficiente, efectiva y presente en bajas cantidades, lo cual permite el desarrollo de un método alternativo de detección y diagnóstico rápido, eficaz y certero para pacientes infectados con VRSh, a modo de poder determinar un tratamiento temprano y adecuado que influya en la evolución de la enfermedad.

Desde el punto de vista terapéutico, actualmente la única solución estandar utilizada para prevenir los casos potencialmente mas graves de la infección con VRSh en la población más vulnerable es el uso del Palivizumab (Olchanski, et. al., 2018). Este es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra otra proteína del VRSh, la proteína F. El mecanismo de acción de este anticuerpo, es la neutralización de la entrada del virus a la célula blanco, por lo que requiere múltiples administraciones durante el periodo invernal. Dado que este anticuerpo reconoce una proteína de superficie altamente variable del virus, algunas de las cepas no son reconocidas por este anticuerpo, lo que hace inefectivo su uso. Como solución alternativa a este problema, los inventores han demostrado que el anticuerpo anti proteína N de la presente invención es también eficaz previniendo el desarrollo de la manifestación pulmonar de la infección con VRSh, lo que permite proponer su uso para la preparación de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento y/o profilaxis de infección por VRSh. Este nuevo anticuerpo tiene la ventaja adicional de que la proteína N (Collins et. al, 2013) tiene una variabilidad menor a la de la proteína F, por lo que permite el reconocimiento de un mayor número de cepas del virus.

Descripción de Figuras

Figura 1: Verificación de la producción de anticuerpos anti-N por parte del hibridoma. Técnica de ELISA que demuestra la afinidad del anticuerpo Anti-N hacia la proteína N y no a hacia otras proteínas virales. Para determinar la actividad desde el sobrenadante de los cultivos de hibridoma cultivado por dos técnicas diferentes, se

midió por ELISA la especificidad de los anticuerpos por su ligando. En la figura se muestra: Anti-N lote 1 = sobrenadante obtenido desde el primer lote de células de hibridoma crecidas en una placa de 6 pocillos. Anti-N lote 2 = sobrenadante obtenido desde el segundo lote de células de hibridoma crecidas en una botella T75 y sonicadas. Anti-N control positivo = Anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína N, que se utiliza como primer control positivo en este ensayo. Los sobrenadantes se evaluaron en pocillos sin activar, activados con proteína N de VRSh, y activados con proteína F de VRSh. Posteriormente se detectó la conjugación con un anticuerpo secundario marcado con HRP (peroxidasa de rábano), adicionalmente se incluyó un control con sólo el anticuerpo secundario = Solo HRP. Los resultados muestran que el anticuerpo de la invención, obtenido con cualquiera de los dos métodos de cultivo de hibridomas, tiene un alto reconocimiento de la proteína N, casi el triple del control positivo, de anticuerpo policlonal anti N.

Figura 2: Evaluación de la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-N por la proteína N por medio de la técnica de dot blot. La imagen representa la especificidad del Anticuerpos para antígeno N de VRS, a través de un ensayo de Dot blot. (A) Se muestra con qué proteína fue sensibilizado cada círculo de la membrana. Cada membrana fue impregnada con 5 proteínas en 5 puntos PBS y BSA fueron utilizados como controles de vehículo, la proteína F de VRSh se usó como control de especificidad y como control positivo de la técnica, y finalmente dos puntos con proteína N como Antígeno. (B) Imagen obtenida luego de 5 minutos de exposición con Ac total, corresponde al sobrenadante del hibridoma antes de purificarlo. Ac purificado, que es el anticuerpo Anti N de la invención, el anticuerpo comercial Palivizumab que reconoce proteína F, y Anticuerpo policlonal anti N. Los resultados muestran que el anticuerpo de la invención tanto en el sobrenadante total, como purificado reconoce fuerte y específicamente la proteína N de VRSh.

Figura 3: Establecimiento del ELISA como técnica que permite verificar la producción del anticuerpo anti-N entre lotes, además de corroborar su

especificidad y sensibilidad. En A se muestra los resultados de un ELISA de las fracciones de sobrenadantes del hibridoma purificados en diferentes ensayos. Lote 1 es una primera purificación. Lote 2 corresponde a una purificación realizada posteriormente, que se hizo a partir del sobrenadante obtenido de un cultivo en placa de 6 (Lote 2 placa) y de una botella T75 (Lote 2 botella). El Control positivo de especificidad corresponde a un anticuerpo anti-M2 que reconoce la proteína viral M2. Los pocillos estaban activados con proteínas N y M2 del VRSh. SA = pocillos sin activar. N (2rio) y M (2rio) corresponden a pocillos activados donde no se agregó el anticuerpo primario. Por otro lado en B, se muestran diluciones seriadas de una fracción purificada del anticuerpo anti-N de la invención, con el fin de lograr la dilución límite de detección de la proteína N. En este ensayo también se evalúa la especificidad del anticuerpo anti-N al no ver reactividad contra otras proteínas del VRSh como la F, así como en los pocillos sin activar (SA) o en los que no se adicionó el anticuerpo primario N (2rio) y F (2rio). Como control negativo se empleó otro anticuerpo del mismo Isotipo IgG2A que no reconoce proteína N (Isotipo) y como control de especificidad se empleó Palivizumab, que reconoció la proteína F.

Figura 4: Evaluación de la concentración mínima de proteína N detectada por el anticuerpo anti-N. La figura corresponde a los resultados de un ELISA realizado con pocillos activados con diluciones seriadas de la proteína N de VRSh, partiendo desde 50 ng hasta 0,375 ng y a una dilución constante del anticuerpo anti-N de la invención (1/5000). En este ELISA se incluyeron los controles técnicos de pocillos sin activar (SA) y activados con la proteína N, pero sólo revelado con el anticuerpo secundario [N (2rio)]. Los resultados muestran que el anticuerpo es capaz de reconocer de una manera confiable hasta 6,25 ng de proteína N.

Figura 5: Capacidad del anticuerpo anti-N de detectar células infectadas con VRSh por la técnica de citometría de flujo. En la figura (5 A) se muestra un cultivo de células Hep-2 infectadas con $1,8 \times 10^5$ PFUs de VRSh que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). El cultivo se mantuvo durante 48 horas para promover la

replicación del VRSh y poder detectar las células infectadas por medio de citometría de flujo al expresar la proteína GFP. Posteriormente, las células se fijaron con PFA al 4% y se permeabilizaron con saponina al 0,2% para teñir intracelularmente con el anticuerpo anti-N seguido de la tinción con anticuerpo secundario acoplado a APC. De esta manera se pudo medir de manera consecutiva las células infectadas (GFP+) y del anticuerpo anti-N. Como controles de la citometría se utilizaron células sin infectar, células infectadas sin teñir con el anticuerpo anti-N y células teñidas sólo con el anticuerpo secundario. En la figura 5 se puede observar que todas las células infectadas con el VRSh (GFP+) son identificadas con la tinción con el anticuerpo anti-N (GFP+ anti-N+). Los resultados se resumen en el gráfico (5 B).

Figura 6: Evaluación de la capacidad terapéutica del anticuerpo anti-N en modelos pre-clínicos. Se grafican los resultados de un ensayo de citometría de flujo en la que se evaluó el número de granulocitos neutrófilos infiltrantes en el pulmón (6 A) en el fluido de lavado bronquioalveolar (BALF) de animales previamente inmunizados con el anticuerpo de la invención al día 4 post infección con VRSh. Se observa el control sin infectar = Mock, el control de animales no inmunizados, con infección del virus = VRSh, control de animales inmunizados previamente con el anticuerpo comercial anti proteína F de VRSh = Palivizumab (anti F), animales inmunizados previamente con el anticuerpo de la invención = Anti-N, y control de Isotipo, es decir otro anticuerpo del mismo Isotipo, IgG2A, que no reconoce proteína N.

Adicionalmente se grafican los resultados de un PCR en tiempo real que midió la carga viral (6 B), animales previamente inmunizados con el anticuerpo de la invención al día 4 post infección con VRSh. Se observa el control sin infectar = Mock, el control de animales no inmunizados, con infección del virus = VRSh, control de animales inmunizados previamente con el anticuerpo comercial anti proteína F de VRSh = Palivizumab (anti F), animales inmunizados previamente con el anticuerpo anti proteína N de la invención = Anti-N, y control de Isotipo. En todos los casos la dosis de anticuerpos fue de 5 mg/kg.

Descripción de la invención

La presente invención apunta a un anticuerpo monoclonal específico para el virus respiratorio sincicial (VRS). Concretamente, al anticuerpo monoclonal IgG2A secretado por una línea celular de hibridoma generada en el laboratorio, dirigido específicamente para el antígeno viral N, el cual está asociado a la nucleocápside del virus. El anticuerpo puede ser utilizado para ensayos de detección y/o determinación de infección por VRSh. Este anticuerpo se encuentra en estado puro y libre de cualquier otro material biológico contaminante.

Los inventores han secuenciado el anticuerpo de la invención, donde la secuencia de la región variable de la cadena pesada se encuentra en la SEQ ID No. 2, y la secuencia nucleotídica que la codifica se encuentra en la SEQ ID No. 1. Adicionalmente, la secuencia de la región variable de la cadena liviana se encuentra en la SEQ ID No. 4, y la secuencia nucleotídica que la codifica se encuentra en la SEQ ID No. 3. Los CDR de este anticuerpo se encuentran en sus secuencias peptídicas en las SEQ ID Nos. 5, 6 y 7 para la cadena pesada y en las SEQ ID Nos. 11, 12 y 13 para la cadena liviana. Mientras que las secuencias nucleotídicas que los codifican se encuentran en las SEQ ID Nos. 8, 9 y 10 para la cadena pesada y en las SEQ ID Nos. 14, 15 y 16 para la cadena liviana.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para prevención y tratamiento de la infección causada por virus respiratorio sincicial humano (VRSh) en un hospedero dado, el cual comprende la administración de una composición que comprende el anticuerpo monoclonal de la invención, en dosis suficientes para prevenir la enfermedad. En el caso de un uso en humanos, el anticuerpo puede ser humanizado para minimizar la posibilidad de una respuesta inmune contra el hospedero (paciente) que lo utiliza.

Además, la invención permite proveer la formulación de cualquier forma farmacéutica del anticuerpo monoclonal de la invención para el tratamiento o prevención de la enfermedad causada por VRSh.

La invención también proporciona métodos de diagnóstico y detección de antígenos virales de VRSh en muestras biológicas, en los cuales se utilicen el anticuerpo monoclonal de la invención en ensayos tales como: ELISA, Microscopía de Inmunofluorescencia, Inmunohistoquímica, Citometría de flujo, Purificación de células (Cell Sorter, por fluorescencia, mediante asociación a esferas magnéticas o cualquier método de separación que utilice el anticuerpo), Inmunoprecipitación, Western blot y Cromatografía. Las muestras pueden ser células *in vitro* infectadas con VRSh o muestras obtenidas de individuos sospechosos de infección por VRSh. En el caso de muestras de un individuo, ellas pueden corresponder a secreciones nasales, lavados nasales, secreciones faríngeas, lavados o secreciones bronquiales o cualquier otro tipo de muestra que se considere apropiada. La invención proporciona la oportunidad de desarrollar un método de aislamiento y detección de virus respiratorio sincicial en muestras biológicas y cultivos celulares que se pongan en contacto con el anticuerpo monoclonal de la invención acoplado en cualquier tipo de soporte sólido, como por ejemplo nitrocelulosa, membrana de nailon u otro soporte. El invento presenta la oportunidad de desarrollar kits de detección rápida para Virus Respiratorio Sincicial o similar, que contenga el anticuerpo de la invención. Además proporciona la posibilidad de incorporar cualquier tipo de molécula o sustrato unida químicamente al anticuerpo monoclonal de la invención, tales como fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales, enzimas y/o cualquier elemento químico acoplado a los anticuerpos monoclonales mencionados, como método de detección, tratamiento, análisis y/o diagnóstico en muestras biológicas. La invención presenta gran potencial de ser utilizado como método terapéutico, o profilaxis para uso en humanos, para lo cual se deberá humanizar.

De este modo la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal de isotipo IgG2A que reconoce específicamente la proteína N, de la nucleocápside del Virus Respiratorio Sincicial humano (VRSh).

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 de los resultados obtenidos con los mismos; 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 el test 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, etc.

El VRSh es un virus de ARN envuelto que pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae* (Alfonso et. al, 2016). Su ARN se transcribe en 10 ARNm, cada uno de los cuales codifica una proteína viral, con excepción del ARNm M2, el cual tiene dos marcos de lectura abiertos (ORF) solapados en 22 nucleótidos que codifican dos proteínas diferentes M2-1 y M2-2. Las proteínas codificadas por los otros ARNm son la nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína L, proteína matriz (M),

NS1, NS2, SH, proteína de fusión (F) y G (Collins et. al., 2013). La proteína N se asocia con el ARN genómico formando la nucleocápside, L es una ARN polimerasa asociada a la nucleocápside, P interactúa con N y L, M es una proteína no glicosilada que se encuentra en la cara interna de la envoltura viral, NS1 y NS2 son proteínas no estructurales, y SH, G y F forman parte de la envoltura viral. Los kits de diagnóstico de VRS desarrollados hasta ahora utilizan anticuerpos contra las proteínas F, N y/o G del VRS, y los anticuerpos sugeridos para el tratamiento o profilaxis de la infección por VRS también están dirigidos a las proteínas F, M2 y G (CL948-96, CN101130765, US6790611, WO2009088159, Muñoz-Durango et. al., 2018).

N es un polipéptido de 44Kd de peso molecular que pertenece a la nucleocápside del Virus junto a la proteína P y L. Investigaciones recientes señalan que esta proteína N estaría interfiriendo en la función de células del sistema inmune -específicamente células dendríticas y linfocitos T-, (Céspedes PF et al. 2014). Este hallazgo permite suponer que este antígeno puede ser considerado como blanco de nuevas terapias antivirales.

A partir de las investigaciones realizadas para la presente invención, relacionadas con los efectos que antígenos virales derivados de Virus Respiratorio Sincicial humano (VRSh) tienen sobre el sistema inmune; se generaron anticuerpos monoclonales murinos específicos para detección de antígenos de VRS que presentan ventajas con respecto a los disponibles comercialmente. Específicamente, el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma generado en el laboratorio de los inventores resultó ser de mucha utilidad para determinar infección de VRSh en ensayos inmunológicos tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando diversas técnicas de detección. Debido a esto, dichos anticuerpos permiten disponer de una herramienta valiosa para detección, diagnóstico y/o terapia de infección causada por Virus Respiratorio Sincicial humano. El anticuerpo monoclonal de la invención puede tener múltiples aplicaciones de uso diagnóstico y terapéutico, tales como su uso en técnicas de inmunoblot, inmunofluorescencia, inmunocromatografía, citometría de flujo, producción de formas farmacéuticas que lo

comprenden, o cualquier otra que involucre su utilización, incluido para uso humano. El anticuerpo puede encontrarse unido a un marcador que permita su detección. Ejemplos de posibles marcadores corresponden a fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales, enzimas y cualquier otro tipo de marcador apropiado para anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal de la invención puede encontrarse en su forma natural, tal como es secretado por el hibridoma, o también como fragmentos de unión a antígeno. Los fragmentos de unión a antígeno son fragmentos del anticuerpo capaces de unirse al antígeno, tales como los fragmentos Fab o Fab'. En la presente solicitud, las aplicaciones del anticuerpo de la invención, aunque mencionan el uso del anticuerpo, también incluyen el uso de fragmentos de unión del anticuerpo monoclonal anti-N. Además, en el caso de la generación de composiciones que comprenden al anticuerpo de la invención, dichas composiciones pueden comprender al anticuerpo murino o al anticuerpo de la invención humanizado o quimérico. Esto es especialmente útil en composiciones para administración en humanos, como una forma de minimizar la posibilidad de que el sistema inmune del individuo tratado con la composición, genere una respuesta contra los anticuerpos de la invención.

De esta forma la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que se une a la nucleoproteína proteína N del virus respiratorio sincicial humano (VRSh) donde dicho anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada con al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID No:2 y tiene una región variable de la cadena liviana con al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID No:4. Asimismo, la invención también se puede definir como un anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que se une a la nucleoproteína proteína N de VRS, en el que su región variable de la cadena pesada está codificada en una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID No:1 y su respectiva secuencia reversa complementaria y su región variable de la cadena liviana

está codificada en una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID No:3.

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención, que se une a la nucleoproteína proteína N del virus respiratorio sincicial humano (VRSh) tiene una región variable de la cadena pesada cuyos CDR1, CDR2 y CDR3 son codificados por secuencias que tienen al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con las SEQ ID No:8, SEQ ID No:9 y SEQ ID No:10, respectivamente, y tiene una región variable de la cadena liviana cuyos CDR1, CDR2 y CDR3, son codificados por secuencias que tienen al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con las SEQ ID No:14, SEQ ID No:15 y SEQ ID No:16 respectivamente.

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención, que se une a la nucleoproteína proteína N del virus respiratorio sincicial humano (VRSh) tiene una región variable de la cadena pesada cuyos CDR1, CDR2 y CDR3 tienen secuencias aminoacídicas con al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con las SEQ ID No:5, SEQ ID No:6 y SEQ ID No: 7, respectivamente, y al mismo tiempo tiene una región variable de la cadena liviana cuyos CDR1, CDR2 y CDR3 tienen secuencias aminoacídicas con al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con las SEQ ID No:11, SEQ ID No:12 y SEQ ID No: 13, respectivamente.

Para el experto en la técnica será evidente que el anticuerpo monoclonal o su fragmento funcional, que se une a la nucleoproteína proteína N de VRSh, puede modificarse en las regiones adyacentes a las regiones variables para obtener un anticuerpo quimérico, en especial un anticuerpo humanizado. Donde la especificidad de dicho anticuerpo quimérico o humanizado está dada por las regiones variables, según se definen en el párrafo anterior, es decir una región variable de la cadena pesada con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:2 y una región variable de la cadena liviana con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:4.

En una realización, la invención provee una composición farmacéutica para el tratamiento y/o profilaxis de la infección causada por VRS donde esta composición

comprende el anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que se une a la nucleoproteína proteína N de VRS según se ha definido, es decir que tiene una región variable de la cadena pesada con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:2 y tiene una región variable de la cadena liviana con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:4 y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención provee un método de detección de virus respiratorio sincicial humano en una muestra, el que comprende contactar la muestra con el anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que se une a la nucleoproteína proteína N de VRSh según se ha definido, es decir que tiene una región variable de la cadena pesada con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:2 y tiene una región variable de la cadena liviana con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:4 y detectar la unión del anticuerpo con el antígeno. Donde la técnica utilizada para detectar la unión del anticuerpo con el antígeno corresponde a ELISA, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, citometría de flujo, cell sorter, inmunoprecipitación, Western blot, o cualquier otra disponible en la técnica. Alternativamente, el anticuerpo o fragmento de él, según se ha definido, es decir que tiene una región variable de la cadena pesada con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:2 y tiene una región variable de la cadena liviana con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:4, se encuentra conjugado con un marcador que permite su detección. Donde dicho marcador se selecciona del grupo compuesto por fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales, enzimas o cualquier otro marcador disponible en la técnica.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de él según se ha definido, es decir que tiene una región variable de la cadena pesada con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:2 y tiene una región variable de la cadena liviana con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:4, se encuentra inmovilizado en un soporte sólido. Donde dicho soporte sólido se escoge entre nitrocelulosa, celulosa, polietileno, nailon, o cualquier otro soporte apropiado disponible en la técnica.

Finalmente, la invención también apunta a un método de tratamiento o profilaxis de una infección por virus sincial el que comprende administrar a un animal o un ser humano, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que se une a la nucleoproteína proteína N de VRS que tiene una región variable de la cadena pesada con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:2 y tiene una región variable de la cadena liviana con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:4 y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida esta composición farmacéutica se administra por vía intramuscular.

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

Ejemplo 1: Obtención de Anticuerpo de la invención.

Los inventores obtuvieron el hibridoma secretor del anticuerpo monoclonal anti N. Este hibridoma se cultivó durante aproximadamente un mes y se logró obtener un cultivo estable de las células. A partir de este cultivo estable, se generaron múltiples alícuotas correspondientes a stocks guardados a -150°C. El anticuerpo de la invención se secuenció, y las secuencias se divulgan en esta patente. La secuencia de la región variable de la cadena pesada se encuentra en la SEQ ID No. 2, y la secuencia nucleotídica que la codifica se encuentra en la SEQ ID No. 1. Adicionalmente, la secuencia de la región variable de la cadena liviana se encuentra en la SEQ ID No. 4, y la secuencia nucleotídica que la codifica se encuentra en la SEQ ID No. 3.

Ejemplo 2: Ensayo de detección de antígenos VRS, especificidad del anticuerpo monoclonal anti N para antígenos purificados de VRS.

Se realizó un ELISA para comprobar que los anticuerpos secretados por las células de hibridoma reconocen la proteína N del VRS. Se sensibilizó la placa con proteína N y

F para evaluar la especificidad del anticuerpo, como control se usó una placa sin activar, y se evaluó también placas con sólo el anticuerpo secundario. Como se observa en la Figura 1, los anticuerpos de la invención, evaluados como los sobrenadantes de los hibridomas (lote 1 y lote 2) son capaces de reconocer sólo a la proteína N y no reconocen a la proteína F, lo que sugiere una alta especificidad del anticuerpo por la proteína N. Como se indicó en la descripción de las figuras, el anticuerpo de la invención, tiene una alta tasa de reconocimiento de la proteína N, casi el triple del control positivo, anticuerpo policlonal anti N.

Se realizó un segundo ensayo para evaluar la especificidad del anticuerpo de la invención, empleando la técnica de dot blot. Cada membrana se sensibilizó con proteína N de VRSh en 2 puntos, 2 controles negativos (PBS [tampón fosfato salino] y BSA [albúmina de suero bovino]) y proteína F de VRS. Los resultados se muestran en la figura 2, se evaluó el sobrenadante del hibridoma completo (Ac total), el anticuerpo de la invención purificado (Ac purificado), Palivizumab®, que reconoció proteína F de VRS, y un anticuerpo policlonal anti proteína N de VRS. Los resultados muestran que el anticuerpo de la invención tanto en el sobrenadante total, como purificado reconoce fuerte y específicamente la proteína N de VRSh.

Ejemplo 3: Ensayo para determinar la eficiencia y la especificidad del anticuerpo monoclonal para detectar antígenos virales.

Luego de determinar que el anticuerpo purificado reconoce a la proteína N del VRSh, se realizó un ELISA para asegurar la especificidad de este. En este ELISA se utilizaron distintas concentraciones de los anticuerpos primarios y se mantuvo constante la concentración de la proteína N (50 ng). Se utilizó como control de especificidad un anticuerpo α -M2 que va dirigido contra la proteína viral M2 y un anticuerpo comercial anti F que va dirigido contra la proteína viral F. En la figura 3A se puede observar que el anticuerpo es capaz de unirse a la proteína N, sin observarse señal en los pocillos activados con proteína M2 o sin activar (SA). Los anticuerpos de la invención se

evaluaron a partir de 2 producciones diferentes, Lote 1 es una primera purificación. Lote 2 corresponde a una purificación realizada posteriormente, donde simultáneamente se realizó un cultivo del hibridoma en placa y en botella T75. Los resultados muestran una gran eficiencia del Anticuerpo de la invención en detectar la proteína N de VRS, sin diferencias significativas entre las distintas purificaciones ensayadas. A partir de una fracción purificada y concentrada del anticuerpo anti-N, se realizaron diluciones a partir de 1/2000 para determinar la cantidad mínima de anticuerpo anti-N capaz de reconocer la proteína N. Como se muestra en la figura 3B, nuevamente se determinó la capacidad que tiene el anticuerpo anti-N de unirse a la proteína N, sin observarse señal en los pocillos activados con proteína F o sin activar (SA). Los resultados muestran que incluso en la menor concentración estudiada, 1/80000, el anticuerpo de la invención permite detectar la presencia de proteína N de VRSh.

Ejemplo 4. Sensibilidad del anticuerpo monoclonal anti N para antígenos de VRS.

Con el fin de determinar la cantidad mínima de proteína N que era capaz de detectar el anticuerpo anti-N de la invención (sensibilidad analítica), se realizaron diluciones seriadas de la proteína N, partiendo desde 50 ng hasta 0,375 ng. Luego, por medio de la técnica de ELISA y a una dilución constante del anticuerpo anti-N (1/5000) se determinó que el anticuerpo es capaz de reconocer de una manera confiable hasta 6,25 ng de proteína N, tal como se muestra en la figura 4.

Ejemplo 5. Detección de células humanas infectadas con VRS, mediante citometría de flujo, utilizando el anticuerpo anti-N.

Para evaluar la capacidad del anticuerpo anti-N de detectar células humanas infectadas con el VRSh, se utilizó la línea celular Hep-2 que corresponde a un epitelio de carcinoma humano. Estas células fueron infectadas *in vitro* durante 2 horas con $1,8 \times 10^4$ PFU del VRSh que expresa la proteína verde fluorescente cuando el virus se

replica (GFP). El cultivo se mantuvo durante 48 horas para promover la replicación del VRSh y poder detectar las células infectadas por medio de citometría de flujo al expresar la proteína GFP. Adicionalmente, estas células se fijaron con PFA al 4% y se permeabilizaron con saponina al 0,2% para teñir intracelularmente con el anticuerpo anti-N. Transcurridos 30 minutos de incubación con el anticuerpo anti-N, se lavaron las células y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a alofococianina (APC). De esta manera se pudo medir de manera consecutiva las células infectadas (GFP+) y del anticuerpo anti-N. Como controles de la citometría se utilizaron células sin infectar, células infectadas sin teñir con el anticuerpo anti-N y células teñidas sólo con el anticuerpo secundario. En la figura 5A se puede observar que todas las células infectadas con el VRSh (GFP+) son identificadas con la tinción con el anticuerpo anti-N (GFP+ anti-N+). Además, al cuantificar los datos obtenidos en la citometría de flujo, se puede concluir que el anticuerpo anti-N es capaz de discriminar de manera específica las células infectadas (figura 5B).

Ejemplo 6: Evaluación del efecto profiláctico del anticuerpo de la invención en una infección de VRS.

Para evaluar la capacidad que tiene el anticuerpo de la invención de prevenir la enfermedad o de al menos disminuir sus efectos en el paciente se administró una dosis de 5 mg/kg (200 ug aproximadamente por animal) de anticuerpo monoclonal anti-N, a ratones BALB/c. Se realizaron controles administrando Palivizumab y control de Isotipo a otro grupo de ratones BALB/c. Al día siguiente de la inmunización pasiva, estos animales más un grupo control sin inmunizar fueron infectados con VRSh, al cuarto día post infección se puso punto final al ensayo y se midió el número de neutrófilos infiltrantes en el lavado bronquioalveolar, un parámetro asociado a la gravedad de la enfermedad. Los resultados se muestran en la Figura 6A. Se puede apreciar que la inmunización con el anticuerpo de la invención disminuye el infiltrado de neutrófilos a nivel pulmonar a niveles similares a los logrados con el control

Palivizumab. Un parametro clínico adicional que es importante medir para determinar la gravedad de la enfermedad, es la cuantificación de la carga viral en los pulmones de los ratones infectados. Para determinar la carga viral, se obtiene RNA desde los pulmones de los ratones y a partir de estos se realiza un PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de los genes del virus, en este caso se midió la expresión del gen de la Nucleoproteína (N). Según los resultados mostrados en la figura 6B el anticuerpo anti-N de la invención es capaz de reducir la carga viral pulmonar, en una infección por VRSh, en una proporción equivalente a la lograda por el anticuerpo comercial anti proteína F de VRSh, Palivizumab.

Estos ejemplos demuestran la especificidad del anticuerpo de la invención, así como su utilidad tanto en detección del virus, y por lo tanto para el desarrollo de métodos de diagnóstico de infección por VRS; y en la neutralización del mismo, y por lo tanto para la producción de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento, protección y/o profilaxis de la infección por VRS.

Referencias.

1. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE; WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. Lancet. 2005 Mar 26-Apr 1;365(9465):1147-52.
2. Cabalka AK. Physiologic risk factors for respiratory viral infections and immunoprophylaxis for respiratory syncytial virus in young children with congenital heart disease. Pediatr Infect Dis J. 2004 Jan;23(1 Suppl):S41-5.
3. Carpenter TC, Stenmark KR. Predisposition of infants with chronic lung disease to respiratory syncytial virus-induced respiratory failure: a vascular hypothesis. Pediatr Infect Dis J. 2004 Jan;23(1 Suppl):S33-40.
4. Weisman L. Populations at risk for developing respiratory syncytial virus and risk factors for respiratory syncytial virus severity: infants with predisposing conditions. Pediatr Infect Dis J. 2003 Feb;22(2 Suppl):S33-7; discussion S37-9.

5. Louis Bont, Paul A. Checchia, Brigitte Fauroux, Josep Figueras-Aloy, Paolo Manzoni, Bosco Paes, Eric A. F. Simões, and Xavier Carbonell-Estrany. Defining the Epidemiology and Burden of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection Among Infants and Children in Western Countries. *Infect Dis Ther*. 2016 Sep; 5(3): 271–298. Published online 2016 Aug 1. doi: 10.1007/s40121-016-0123-0
6. Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*. 1991 Apr;163(4):693-8.
7. Luis F. Avendaño, María Angélica Palomino and Carmen Larrañaga. Surveillance for Respiratory Syncytial Virus in Infants Hospitalized for Acute Lower Respiratory Infection in Chile (1989 to 2000). *J Clin Microbiol*. 2003 Oct; 41(10): 4879–4882. doi: 10.1128/JCM.41.10.4879-4882.2003
8. Collins PL, Fearn R, Graham BS. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;372:3–38. Available from <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-38919-1>
9. Natalia Olchanski, Ryan N Hansen, Elle Pope, Brittany D'Cruz, Jaime Fergie, Mitchell Goldstein, Leonard R Krilov, Kimmie K McLaurin, Barbara Nabrit-Stephens, Gerald Oster, Kenneth Schaecher, Fadia T Shaya, Peter J Neumann and Sean D Sullivan. Palivizumab Prophylaxis for Respiratory Syncytial Virus: Examining the Evidence Around Value Open Forum Infect Dis. 2018 Mar; 5(3): ofy031. Published online 2018 Feb 7. doi: 10.1093/ofid/ofy031
10. Alfonso CL, Amarasinghe GK, Bányai K, et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol*. 2016;161:2351–2360. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-016-2880-1>
11. Natalia Muñoz-Durango, Magdalena S. Pizarro-Ortega, Emma Rey-Jurado, Fabián E. Díaz, Susan M. Bueno and Alexis M. Kalergis. Patterns of antibody response during natural hRSV infection: insights for the development of new antibody-based therapies. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1511699>
12. Céspedes P., Bueno SM, Ramírez BA, Gomez RS, Riquelme SA, Palavecino CE, Mackern-Oberti JP, Mora JE, Depoil D, Sacristán C, Cammer M, Creneguy A, Nguyen TH, Riedel CA, Dustin ML and Kalergis AM. Surface expression of the hRSV nucleoprotein impairs immunological synapse formation with T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Aug 5;111(31):E3214-23. doi: 10.1073/pnas.1400760111. Epub 2014 Jul 23.

PLIEGO DE REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que se une a la nucleoproteína proteína N del virus respiratorio sincicial humano (VRS) CARACTERIZADO porque dicho anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada cuyos CDR1, CDR2 y CDR3 tienen secuencias aminoacídicas con al menos un 97% de identidad con las SEQ ID No:5, SEQ ID No:6 y SEQ ID No: 7, respectivamente, y al mismo tiempo tiene una región variable de la cadena liviana cuyos CDR1, CDR2 y CDR3 tienen secuencias aminoacídicas con al menos un 97% de identidad con las SEQ ID No:11, SEQ ID No:12 y SEQ ID No: 13, respectivamente.
2. Anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que se une a la nucleoproteína proteína N de VRS, de acuerdo a la reivindicación 1 CARACTERIZADO porque tiene una región variable de la cadena pesada cuyos CDR1, CDR2 y CDR3 son codificados por secuencias nucleotídicas que tiene al menos un 95% de identidad con las SEQ ID No:8, SEQ ID No:9 y SEQ ID No:10, respectivamente y su respectivas secuencias reversas complementarias y tiene una región variable de la cadena liviana cuyos CDR1, CDR2 y CDR3, son codificados por secuencias que tienen al menos un 95% de identidad con las SEQ ID No:14, SEQ ID No:15 y SEQ ID No:16 respectivamente y su respectivas secuencias reversas complementarias.
3. Anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que se une a la nucleoproteína proteína N de VRS, de acuerdo a la reivindicación 1 CARACTERIZADO porque el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o quimérico.
4. Composición farmacéutica para el tratamiento y/o profilaxis de la infección causada por VRS CARACTERIZADA porque comprende el anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que se une a la nucleoproteína proteína N de VRS de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
5. Método de detección de virus respiratorio sincicial humano en una muestra CARACTERIZADO porque comprende contactar la muestra con el anticuerpo

monoclonal o un fragmento de este que se une a la nucleoproteína proteína N de VRS de la reivindicación 1 y detectar la unión del anticuerpo con el antígeno

6. Método de acuerdo a la reivindicación 5 , CARACTERIZADO, porque la técnica utilizada para detectar la unión del anticuerpo con el antígeno corresponde a ELISA, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, citometría de flujo, cell sorter, inmunoprecipitación y/o Western blot.
7. Método de acuerdo a la reivindicación 5, CARACTERIZADO, porque el anticuerpo o fragmento de él de acuerdo con la reivindicación 1, se encuentra conjugado con un marcador que permite su detección.
8. Método de acuerdo a la reivindicación 7 CARACTERIZADO, porque el anticuerpo o fragmento de él se encuentra unido a un marcador seleccionado del grupo compuesto por fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales y enzimas.
9. Método de acuerdo a la reivindicación 8 CARACTERIZADO, porque el anticuerpo o fragmento de él se encuentra inmovilizado en un soporte sólido.
10. Método de acuerdo a la reivindicación 9 CARACTERIZADO porque el soporte sólido se escoge entre nitrocelulosa, celulosa, polietileno y nailon.
11. Método de tratamiento o profilaxis de una infección por virus sincial CARACTERIZADO porque comprende administrar la composición farmacéutica de la reivindicación 4.
12. Método de la reivindicación 11 CARACTERIZADO porque la composición se administra por vía intramuscular.

FIGURAS

FIGURA 1

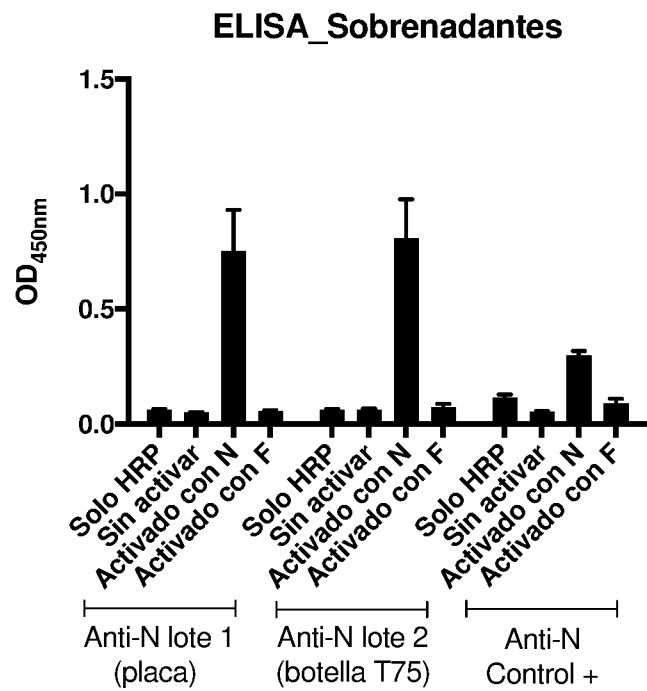


FIGURA 2

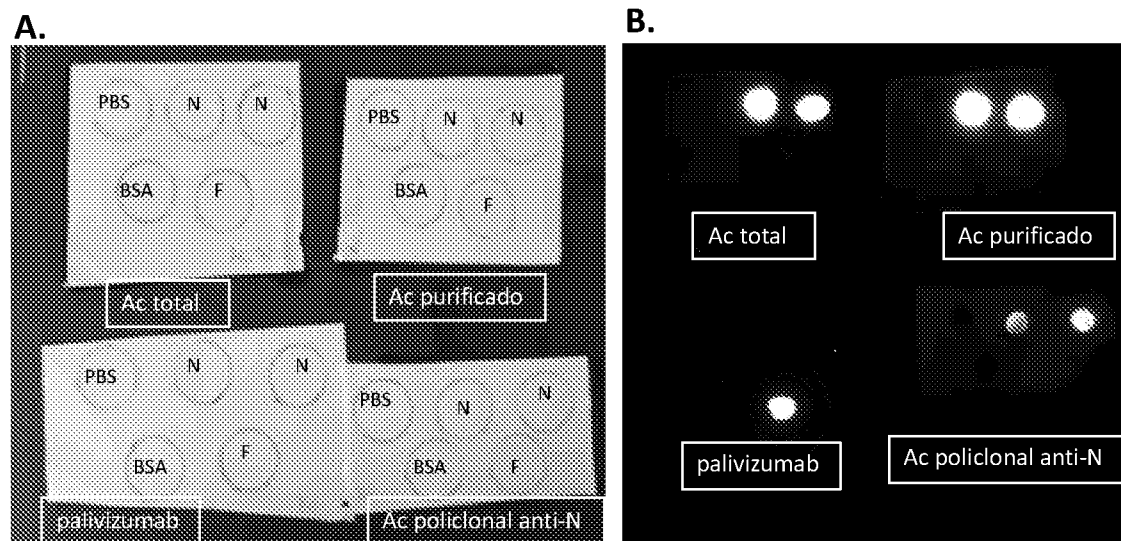


Figura 3

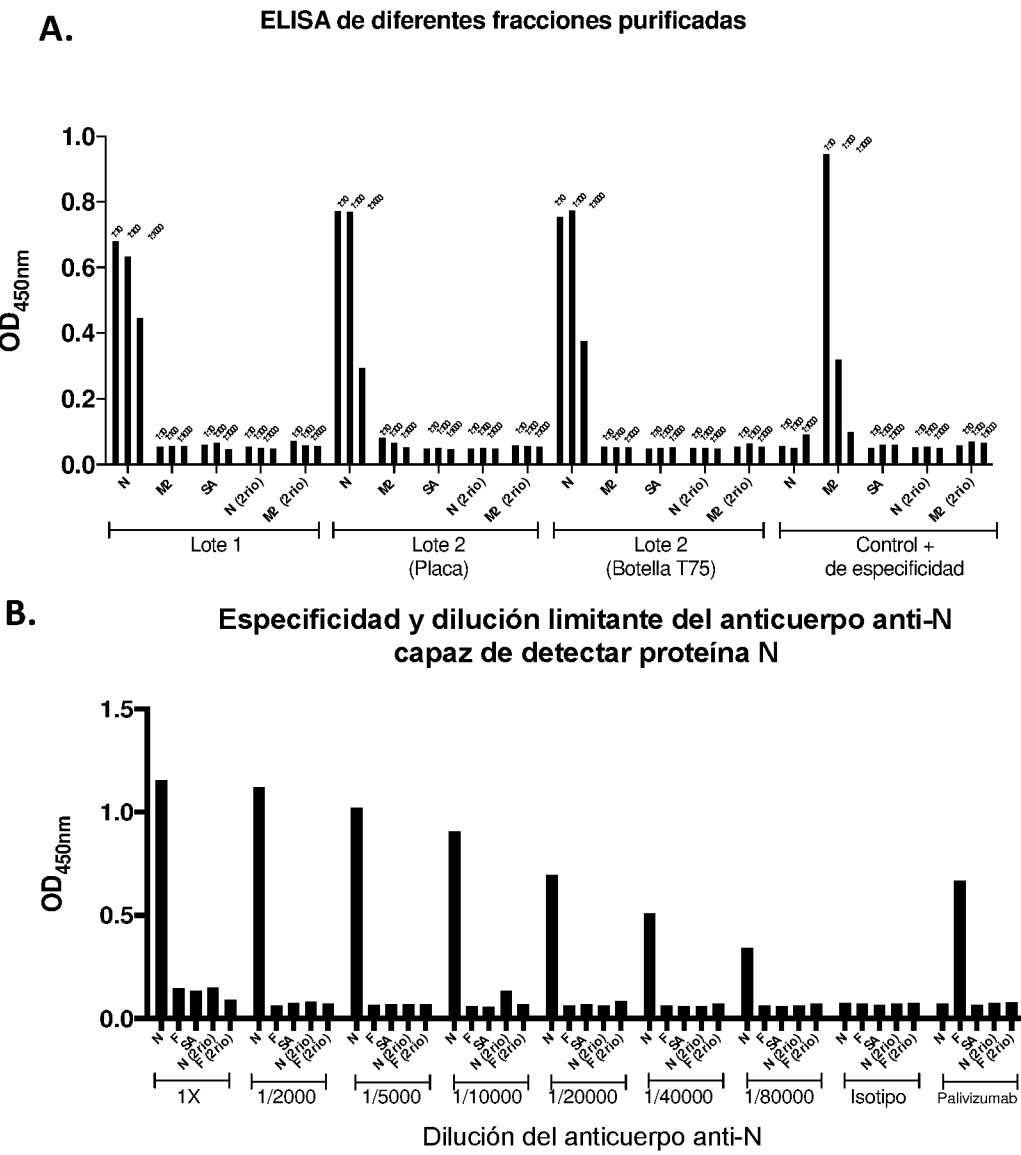


FIGURA 4

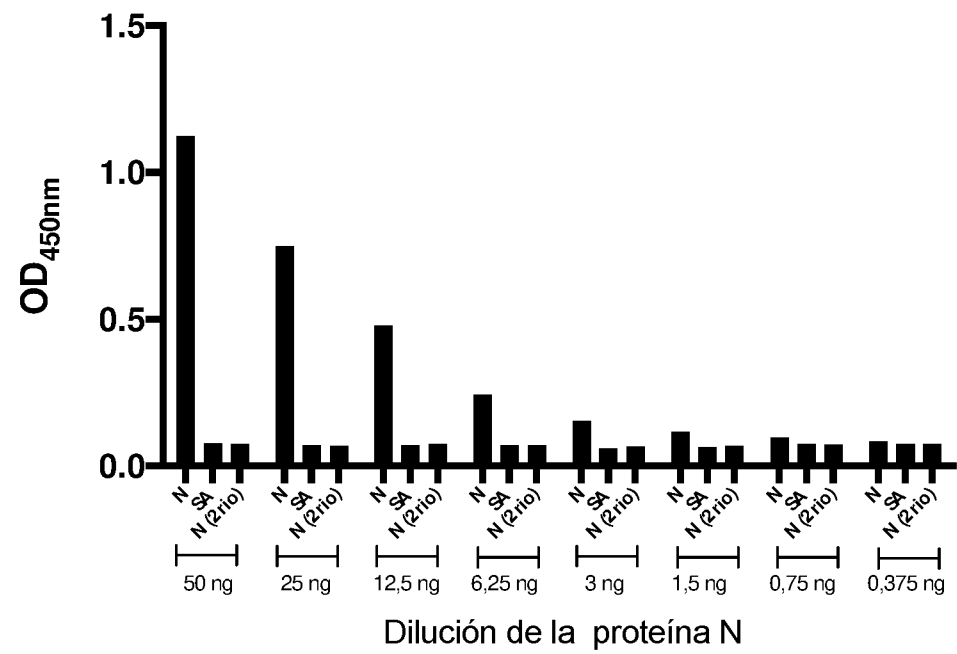


FIGURA 5

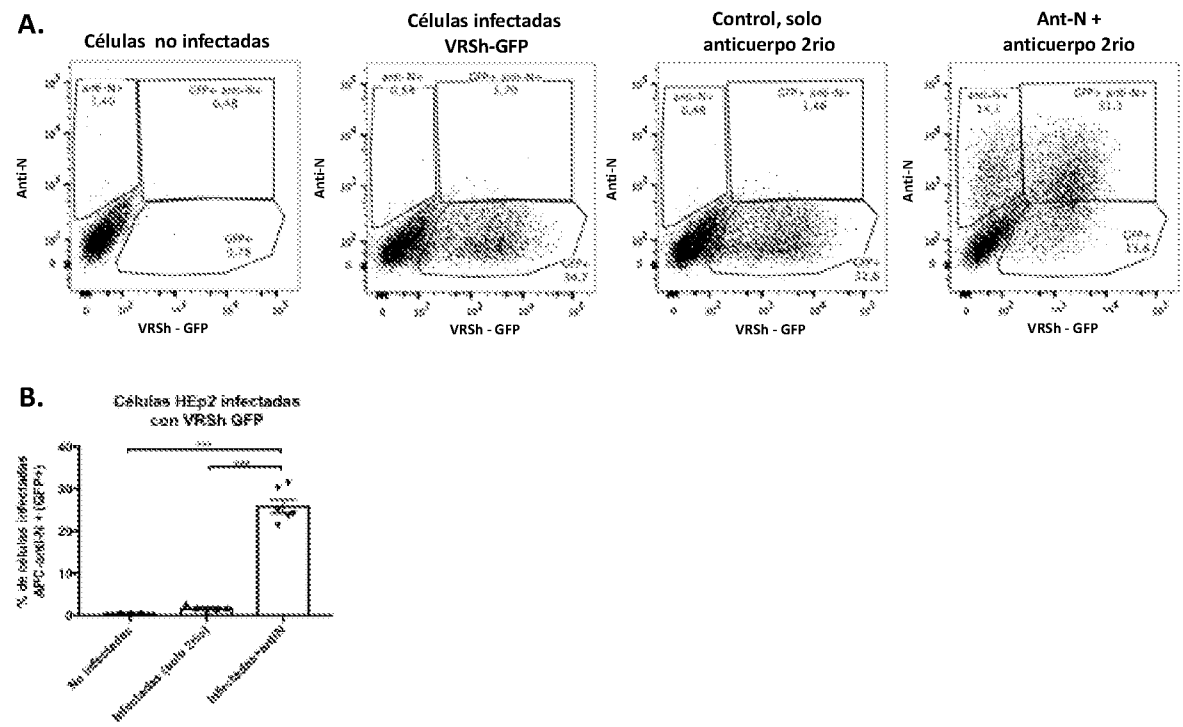
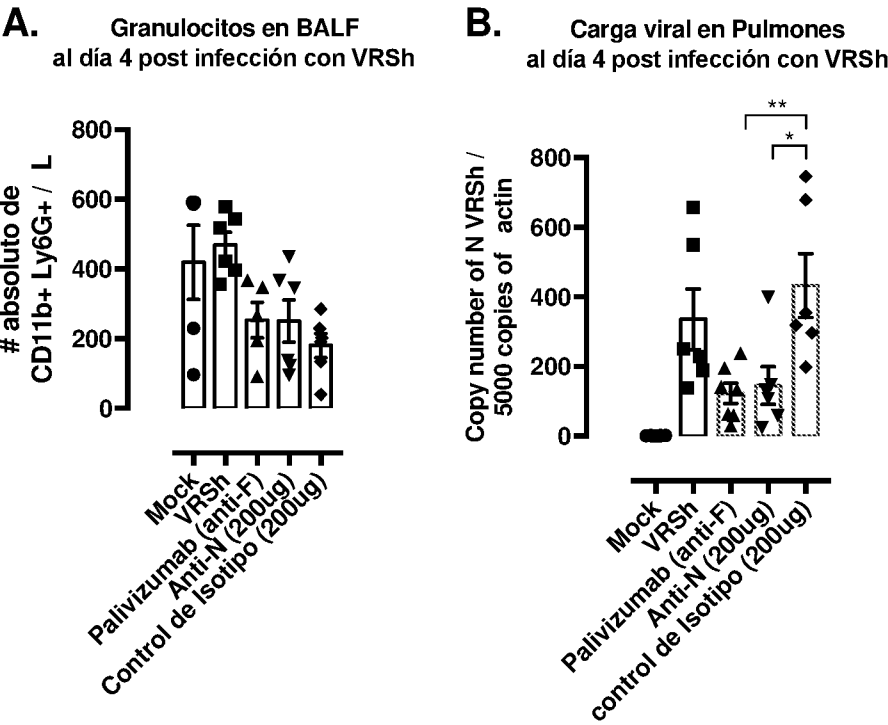


FIGURA 6



A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP: C07K16/10, A61K39/42, G01N33/577, A61P31/14 (2018.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP: C07K16/10, A61K39/42, G01N33/577, A61P31/14 CPC: C07K16/1027

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) STN (CAPLUS, USPATFULL, BIOSIS), ESP@CENET, PATENTSCOPE, GOOGLE SCHOLAR, INAPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	GÓMEZ, R. S. et al. Respiratory syncytial virus detection in cells and clinical samples by using three new monoclonal antibodies. Journal of Medical Virology, 2013; 86(7), 1256-1266. DOI:10.1002/jmv.23807. The whole document	1-10
A	WO 2013/076702 A2 (PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE): 30 May 2013 Figure 1B; SEQ ID NO:4	
X	CN 101130765 A (BEIJING ASCLE BIOENGINEERING C) 27 February 2008 The whole document	1-10
X	MURRAY, J. et al. Characterization of Monoclonal Antibodies Raised against Recombinant Respiratory Syncytial Virus Nucleocapsid (N) Protein: Identification of a Region in the Carboxy Terminus of N Involved in the Interaction with P Protein, Virology, 2001; 289(2): 252-261. DOI: 10.1006/viro.2001.1150. The whole document	1-4

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
21/12/2018 21/December/2018Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
12/02/2019 12/February/2019Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, ChileFuncionario autorizado
GARRIDO, Carolina

N° de fax

N° de teléfono 56-2-28870551

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2018/050079**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2018/050079

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUMARI, S. et al. Development of a Luciferase Immunoprecipitation System Assay To Detect IgG Antibodies against Human Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein. Clin. Vaccine Immunol. Feb 2014, 21 (3) 383-390. DOI: 10.1128/CVI.00594-13. page 384, left column, second paragraph	1-4
A	REY-JURADO, E & KALERGIS, A. M. Immunological Features of Respiratory Syncytial Virus-Caused Pneumonia-Implications for Vaccine Design. <i>Int J Mol Sci.</i> 2017;18(3):556, 19 pages DOI:10.3390/iims18030556. Point 3.1; table 1.	
A	US 2002/0081573 A1 (BESST-TEST APS) 27 June 2002 The whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CL2018/050079

WO 2013/076702 A2	30-05-2013	WO2013076702 (A3)	25-07-2013
		AR088987 (A1)	23-07-2014
		BR112014012608 (A2)	13-06-2017
		CA2856258 (A1)	30-05-2013
		CA2856258 (C)	01-05-2018
		CN103998465 (A)	20-08-2014
		CN103998465 (B)	22-02-2017
		EP2784088 (A2)	01-10-2014
		EP2784088 (A4)	13-05-2015
		EP2784088 (B1)	25-10-2017
		ES2657619 (T3)	06-03-2018
		IN4823CHN2014 (A)	18-09-2015
		MX2014006248 (A)	03-03-2015
		MX349235 (B)	19-07-2017
		PE16832014 (A1)	28-11-2014
		US2014348858 (A1)	27-11-2014
		US9273122 (B2)	01-03-2016
		ZA201403564 (B)	26-08-2015
CN 101130765 A	27-02-2008	CN101130765 (B)	06-04-2011
JS 2002/0081573 A1	27-06-2002	US6790611 (B2)	14-09-2004
		AT403153 (T)	15-08-2008
		AU1038402 (A)	29-04-2002
		AU2002210384 (B2)	19-10-2006
		CA2463678 (A1)	25-04-2002
		DK1340086 (T3)	01-12-2008
		EP1340086 (A1)	03-09-2003
		EP1340086 (B1)	30-07-2008
		JP2004511807 (A)	15-04-2004
		WO0233417 (A1)	25-04-2002

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050079

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP: C07K16/10, A61K39/42, G01N33/577, A61P31/14 (2018.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP: C07K16/10, A61K39/42, G01N33/577, A61P31/14 CPC: C07K16/1027

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) STN (CAPLUS, USPATFULL, BIOSIS), ESP@CENET, PATENTSCOPE, GOOGLE SCHOLAR, INAPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	GÓMEZ, R. S. et al. Respiratory syncytial virus detection in cells and clinical samples by using three new monoclonal antibodies. Journal of Medical Virology, 2013; 86(7), 1256-1266. DOI:10.1002/jmv.23807. Todo el documento	1-10
A	WO 2013/076702 A2 (PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE) 30 de mayo de 2013 Figura 1B; SEQ ID NO:4	
X	CN 101130765 A (BEIJING ASCLE BIOENGINEERING C) 27 de febrero de 2008 Todo el documento.	1-10
X	MURRAY, J. et al. Characterization of Monoclonal Antibodies Raised against Recombinant Respiratory Syncytial Virus Nucleocapsid (N) Protein: Identification of a Region in the Carboxy Terminus of N Involved in the Interaction with P Protein, Virology, 2001; 289(2): 252-261. DOI: 10.1006/viro.2001.1150. Todo el documento.	1-4

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T"

documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&"

documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

21/12/2018

21/diciembre/2018

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

12/02/2019

12/febrero/2019

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile

N° de fax

Funcionario autorizado

GARRIDO, Carolina

N° de teléfono 56-2-28870551

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050079

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias:
 - a. ☒ que forma parte de la solicitud internacional tal y como se presentó:
 - ☒ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
 - ☐ en formato papel o en formato de archivo de imagen.
 - b. ☐ presentada junto con la solicitud internacional de acuerdo a la Regla 13ter.1.a) del PCT exclusivamente a los fines de la búsqueda, en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
 - c. ☐ Presentada con posterioridad a la fecha de presentación exclusivamente a los fines de la búsqueda internacional:
 - ☐ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25 (Regla 13ter.1.a)).
 - ☐ en formato papel o en formato de archivo de imagen (Regla 13ter.1.b) e Instrucciones Administrativas, sección 713).
2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la que formaba parte de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050079

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	KUMARI, S. et al. Development of a Luciferase Immunoprecipitation System Assay To Detect IgG Antibodies against Human Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein. Clin. Vaccine Immunol. Feb 2014, 21 (3) 383-390. DOI: 10.1128/CVI.00594-13. Página 384, columna izquierda, segunda párrafo.	1-4
A	REY-JURADO, E & KALERGIS, A. M. Immunological Features of Respiratory Syncytial Virus-Caused Pneumonia-Implications for Vaccine Design. <i>Int J Mol Sci.</i> 2017;18(3):556, 19 páginas. DOI:10.3390/ijms18030556. Punto 3.1; tabla 1.	
A	US 2002/0081573 A1 (BESST-TEST APS) 27 de junio de 2002 Todo el documento	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050079

Documento de patente citado en Informe de Búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de Familia	Fecha de Publicación
WO 2013/076702 A2	30-05-2013	WO2013076702 (A3) AR088987 (A1) BR112014012608 (A2) CA2856258 (A1) CA2856258 (C) CN103998465 (A) CN103998465 (B) EP2784088 (A2) EP2784088 (A4) EP2784088 (B1) ES2657619 (T3) IN4823CHN2014 (A) MX2014006248 (A) MX349235 (B) PE16832014 (A1) US2014348858 (A1) US9273122 (B2) ZA201403564 (B)	25-07-2013 23-07-2014 13-06-2017 30-05-2013 01-05-2018 20-08-2014 22-02-2017 01-10-2014 13-05-2015 25-10-2017 06-03-2018 18-09-2015 03-03-2015 19-07-2017 28-11-2014 27-11-2014 01-03-2016 26-08-2015
CN 101130765 A	27-02-2008	CN101130765 (B)	06-04-2011
US 2002/0081573 A1	27-06-2002	US6790611 (B2) AT403153 (T) AU1038402 (A) AU2002210384 (B2) CA2463678 (A1) DK1340086 (T3) EP1340086 (A1) EP1340086 (B1) JP2004511807 (A) WO0233417 (A1)	14-09-2004 15-08-2008 29-04-2002 19-10-2006 25-04-2002 01-12-2008 03-09-2003 30-07-2008 15-04-2004 25-04-2002