

(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
05 de marzo de 2020 (05.03.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/041910 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

C07K 16/08 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01) A61P 31/22 (2006.01)

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

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/CL2018/050074

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

(22) Fecha de presentación internacional:

28 de agosto de 2018 (28.08.2018)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

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

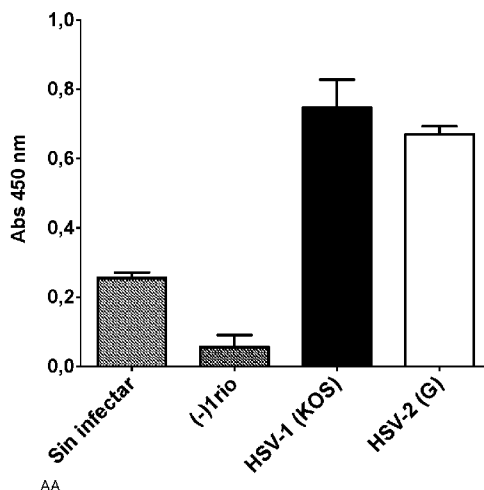
(71) Solicitantes: **PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE** [CL/CL]; Av. Libertador Bernardo OHiggins, 340, Santiago, 8331150 (CL). **FUNDACION CO-**

(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,

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY 14F5F6 OR FRAGMENT THEREOF THAT SPECIFICALLY RECOGNISES HERPES SIMPLEX VIRUS 1 AND 2

(54) Título: ANTICUERPO MONOCLONAL 14F5F6 O FRAGMENTO DEL MISMO, QUE RECONOCE ESPECÍFICAMENTE VIRUS HERPES SIMPLE 1 Y 2

Figura 1



AA Uninfected

(57) Abstract: The present invention relates to a novel monoclonal antibody or fragment thereof, known as 14F5F6, that specifically recognises the two types of herpes simplex virus (HSV), namely herpes simplex virus type 1 and herpes simplex virus type 2 (HSV-1 and HSV-2). The antibody of the invention is preferentially used to develop methods for diagnosing herpes simplex virus infection and for the production of pharmaceutical compositions for use in the treatment, protection and/or prophylaxis of infection, especially that caused by HSV-1 and HSV-2.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, denominado 14F5F6, que reconoce específicamente virus herpes simple (HSV), en sus dos tipos, virus herpes simple de tipo 1 y virus herpes simple de

[Continúa en la página siguiente]

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, 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))*

tipo 2 (HSV-1 y HSV-2). De manera preferida, el anticuerpo de la invención, es útil para el desarrollo de métodos de diagnóstico de infección por virus herpes simple, así como para la producción de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento, protección y/o profilaxis de la infección especialmente causadas por HSV-1 y HSV-2.

**ANTICUERPO MONOCLONAL 14F5F6 O FRAGMENTO DEL MISMO, QUE
RECONOCE ESPECÍFICAMENTE VIRUS HERPES SIMPLE 1 Y 2.**

MEMORIA DESCRIPTIVA

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, que reconoce específicamente virus herpes simple (HSV), en sus dos tipos, virus herpes simple de tipo 1 y virus herpes simple de tipo 2 (HSV-1 y HSV-2).

De manera preferida, el anticuerpo de la invención, es útil para el desarrollo de métodos de diagnóstico de infección por virus herpes simple, así como para la producción de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento, protección y/o profilaxis de la infección especialmente causadas por HSV-1 y HSV-2.

Antecedentes de la Invención

Los virus del grupo de los alfa herpesvirus, tales como el virus herpes simple de tipo 1 (HSV-1), virus herpes simple de tipo 2 (HSV-2) y virus varicela zóster (VZV) afectan a la población general con alta prevalencia, manifestándose con un amplio espectro de patologías que van desde lesiones prolongadas y dolorosas a la piel, infección ocular, lesiones en mucosas, neumonía y hasta encefalitis. Como se ha indicado, la invención se enfoca en 2 de estos virus, HSV-1 y HSV-2.

Actualmente, HSV-1 es la primera causa de ceguera por infección en países desarrollados. HSV-1 es la también la primera causa de herpes genital primario (primo infección) y la primera causa de encefalitis viral en adultos. La prevalencia de este virus se estima en alrededor de 70% en el mundo y es alta tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. En los EE.UU., la prevalencia actual de HSV-1 es de 54%.

Por otro lado, HSV-2 es la principal causa de lesiones genitales recurrentes y principal causa de encefalitis neonatal, la cual puede ser mortal y produce importantes secuelas en los neonatos. Se estima una prevalencia mundial entre 10-20% para HSV-2.

Un problema persistente en el diagnóstico actual de infecciones por estos alfa herpes virus, es que muchas de las manifestaciones clínicas producidas por HSV-1 y HSV-2 pueden confundirse con lesiones y patologías producidas por otros patógenos virales y bacterianos.

Actualmente el diagnóstico de infección por HSV-1 y HSV-2 se realiza principalmente por serología o qPCR. El primer método habitualmente no informa temporalidad ni lugar de la infección y puede ser de limitada utilidad en individuos previamente infectados con el virus. Por otro lado, el segundo método es costoso y requiere de personal altamente calificado, así como material de laboratorio y equipamiento de alto valor. Además, qPCR podría ser una técnica demasiado sensible considerando la prevalencia del virus en la población, conduciendo a la obtención de falsos positivos en el diagnóstico. Con ello, métodos de diagnóstico para HSV-1, HSV-2 y VZV que sean rápidos, de fácil uso y bajo precio de venta permitiría contar con un diagnóstico instantáneo en el sitio de consulta, permitiendo un tratamiento inmediato, descartar infección por otros patógenos e indicar prognosis. Contar con un test rápido elimina la necesidad de los pacientes de reagentar una consulta médica, pues el diagnóstico es *in situ*.

Por otro lado, un diagnóstico inmediato puede ser de gran utilidad para médicos que tratan pacientes inmunosuprimidos o inmunodeficientes, pues estos individuos son altamente susceptibles a infecciones por virus herpes y tienden a manifestar patologías severas y extendidas con estos virus, comparados con pacientes sanos. En todos los casos, un diagnóstico positivo para HSV-1 o HSV-2, permitiría al médico indicar un tratamiento inmediato con antivirales existentes, reduciendo así la duración y severidad de la enfermedad. Además, la determinación de infección por HSV-1, HSV-2 permite al médico informar al paciente de su prognosis, dependiendo del tipo viral involucrado y lugar de infección.

La invención comprende un nuevo anticuerpo monoclonal capaz de detectar antígenos de la cápside de los virus HSV-1 y HSV-2: La detección de estos virus se puede realizar en una modalidad preferida, empleando la técnica ELISA sándwich, que puede ser fácil y apropiadamente implementada en un kit de detección de tipo inmunocromatográfico rápido, de fácil ejecución e interpretación, de bajo costo de producción y por tanto de bajo precio de venta, para detectar la presencia de virus herpes simple de tipo 1 y de tipo 2, en muestras obtenidas desde hisopados de lesiones en piel, hisopado ocular, hisopado de mucosas, o en muestras de plasma o líquido encéfalo-raquídeo, entre otros.

La reducción de los costos y del tiempo de entrega del resultado sumado a una alta especificidad de la detección, hacen que el anticuerpo de la invención, permita una mayor accesibilidad pública para el diagnóstico de infecciones causadas por los alfa herpes virus HSV-1 y HSV-2 y una alternativa de detección rápida para decidir e iniciar a la brevedad, el tratamiento que corresponda, acorde a los resultados que

entregue el análisis de muestras biológicas, con el anticuerpo que es parte de la invención que aquí divulgamos.

De este modo, la invención se traduce en un anticuerpo capaz de detectar bajas cantidades de antígenos de HSV-1 y HSV-2, de manera específica, lo cual permite el desarrollo de un método alternativo de detección y diagnóstico rápido, eficaz y certero para pacientes infectados con alguno de estos virus, a modo de poder determinar un tratamiento temprano y adecuado que permita un tratamiento oportuno de la enfermedad. Además, la eficiencia de nuestro anticuerpo permite proponer su uso para la preparación de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento y/o profilaxis de infección por virus patógenos humanos como lo son los virus del herpes simple de tipo 1 y tipo 2.

El anticuerpo de la invención corresponde específicamente a un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente a la proteína VP21 de la cápside del virus de herpes simple de tipo 1 (HSV-1), pero que es capaz de reconocer tanto la presencia del HSV-1 como de HSV-2 en muestras infectadas con estos virus.

Tal como describimos en detalle más adelante, esta invención se basa en la elección de los inventores por obtener anticuerpos capaces de ser usados para detectar la presencia de los virus patógenos del hombre, HSV-1 y HSV-2. Como parte de la investigación realizada y de la estrategia de obtención de anticuerpos apropiados, se decidió modificar al uso de codón de *E. coli*, la secuencia nucleotídica del gen *UL26* del virus herpes simple HSV-1, el cual fue sobreexpresado en *E. coli*, y posteriormente aislado el producto aminoacídico de dicho gen, la proteína de la cápside VP21 de HSV-1. La proteína recombinante aislada, fue usada para inmunizar ratones y posteriormente obtener por técnicas estándares, el hibridoma monoclonal de la invención que se denominó 14F5F6, y que secreta el anticuerpo de la invención 14F5F6, cuya caracterización se entrega más adelante.

En el estado del arte previo a esta invención existen algunas publicaciones que son cercanas a la invención, las que se resumen brevemente a continuación.

En la solicitud de patente CN105925537, se divulga una célula hibridoma y un anticuerpo monoclonal para la detección de HSV. Este documento divulga las secuencias de los CDR1 y 2 tanto de la cadena pesada como de la cadena liviana del anticuerpo que divulgan; secuencias que se diferencian de los CDR del anticuerpo de la invención, por lo que este documento no adelanta el anticuerpo de la invención.

La patente europea EP3050897 divulga un anticuerpo monoclonal para inmunoterapia pasiva de infecciones causadas por herpes simple HSV-1 y HSV-2. El anticuerpo de EP3050897 está caracterizado por cuatro secuencias codificantes para CDRs y correspondientes secuencias codificantes para las cadena pesada y liviana respectivamente. Si bien este documento apunta a anticuerpos capaces de unirse a HSV-1 y HSV-2, su objetivo no es el de detectar la presencia de estos virus y más importante aún, las secuencias que se reivindican en EP3050897 difieren del anticuerpo de la invención que aquí se protege.

En la solicitud de patente norteamericana US2005130132, se protege la detección de virus herpes simple, para lo cual se obtienen anticuerpos monoclonales que detectan virus HSV-2, pero no se menciona que los anticuerpos producidos se obtuvieran usando VP21 de HSV-1 como antígeno para la inmunización. Además, las secuencias aminoácidas reclamadas en dicho documento no se corresponden con las del anticuerpo de la invención que aquí se divulga.

WO2015095366, este documento busca proteger un método de detección de anticuerpos contra HSV-1 y HSV-2 en el suero de un paciente, haciendo reaccionar el suero del paciente contra antígenos de estos virus inmovilizados en una matriz. Lo anterior indica que en WO2015095366 se busca detectar la presencia de anticuerpos y no se incluye la detección directa de los virus, por lo que reclama una invención distinta a la que aquí se protege.

Queda así en evidencia, que el estado actual de la técnica para la detección de HSV-1 y HSV-2, requiere el desarrollo de nuevos procedimientos que faciliten y aceleren la obtención del resultado, tanto en la disminución del tiempo necesitado como en la no necesidad de contar con personal calificado para llevar a cabo la determinación de la presencia o ausencia de infección por HSV-1 y/o HSV2.

La invención resuelve esta necesidad aportando al estado de la técnica, un anticuerpo monoclonal capaz de detectar, con alta especificidad, la presencia de los virus infecciosos HSV-1 y HSV-2.

Este anticuerpo es útil para emplearse en técnicas de diagnóstico rápidas, de alta especificidad, de bajo costo, toda vez que se puede presentar, por ejemplo, como un test inmunocromatográfico.

Descripción resumida de la invención.

La presente invención hace referencia al uso de un anticuerpo monoclonal específico para diagnosticar infecciones causadas por cualquiera de los alfa herpesvirus HSV-1 y HSV-2.

Concretamente, el anticuerpo monoclonal desarrollado como parte de la invención aquí propuesta, denominado 14F5F6, reconoce con alta especificidad el antígeno VP21 de la cápside de HSV-1 y HSV-2, lo que se correlaciona con la presencia de los virus HSV-1 y HSV-2. De este modo se permite la detección, o diagnóstico, de la presencia del virus en muestras aisladas de pacientes sospechosos de estar infectados por alguno de estos virus. El anticuerpo de la invención se obtiene en estado puro y libre de cualquier otro material biológico contaminante, por lo que puede ser fácilmente utilizado en varios formatos distintos conducentes a la detección y/o determinación de la infección por HSV-1 y HSV-2.

En un aspecto preferido de la invención, el anticuerpo de la invención puede ser utilizado para ensayos de detección y/o determinación de la infección causada por HSV-1.

En otro aspecto preferido, el anticuerpo de la invención puede ser utilizado para ensayos de detección y/o determinación de la infección causada por HSV-2.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para prevención y tratamiento de la infección causada por HSV-1 y/o HSV-2 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 y tratar 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 esta invención y, que sean adecuados para el diagnóstico, tratamiento o prevención de la infección causada por HSV-1 y/o HSV-2.

El anticuerpo de la invención también puede ser implementado en distintos métodos de diagnóstico y detección de antígenos virales de HSV-1 y/o HSV-2 en muestras biológicas, por ejemplo en ensayos tales como: ELISA, Microscopia de fluorescencia (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 HSV-1 y/o HSV-2 o muestras obtenidas de individuos sospechosos de infección por HSV-1 y HSV-2. En

el caso de muestras de un individuo, ellas pueden corresponder a hisopado oral, de ojos, de mucosas, líquido encéfalo-raquídeo, o cualquier otro tipo de muestra que se considere apropiada.

La invención proporciona además, la oportunidad de desarrollar un método de aislamiento y detección de HSV-1 y/o HSV-2 en muestras biológicas y cultivos celulares que se pongan en contactos con el anticuerpo monoclonal aportado en esta invención, acoplados en cualquier tipo de soporte sólido, como por ejemplo nitrocelulosa, membrana de nylon u otro soporte.

En un aspecto preferido, el anticuerpo de la invención es útil en el desarrollo de kits de detección rápida para HSV-1 y/o HSV-2 o similares alfa herpesvirus, que contenga segmentos antigénicos reconocibles por el anticuerpo de la invención aquí divulgada.

Además, el anticuerpo de esta invención proporcionan la posibilidad de incorporarle, cualquier tipo de molécula o sustrato unida químicamente, tales como fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales, enzimas y/o cualquier elemento químico acoplado al anticuerpo monoclonal mencionado, como método de detección, tratamiento, análisis y/o diagnóstico en muestras biológicas.

Descripción de las Figuras

Figura 1: Detección de antígenos de HSV-1 y HSV-2 por el anticuerpo 14F5F6 en ELISA directo. Esta figura muestra la especificidad del anticuerpo monoclonal 14F5F6 de la invención en ensayos de ELISA directo utilizando como antígenos, extractos de proteínas de células VERO (ATCC® CCL-81™ *Cercopithecus aethiops, kidney epithelial cells*) infectadas con **HSV-1** (cepa viral de referencia KOS) o bien **HSV-2** (cepa de referencia G). En este ensayo se incluyó como control negativo: **sin infectar** y extracto de HSV-2 incubado solo con anticuerpo secundario ((-)1rio).

Figura 2: Detección de antígenos de HSV-1 y HSV-2 por el anticuerpo 14F5F6 en ELISA de tipo sándwich. Se evaluó la reactividad en ensayo ELISA tipo *sándwich*, del anticuerpo de la invención empleando anticuerpo del clon del hibridoma 14F5F6 contra extractos proteicos, tanto de células VERO infectadas con HSV-1 (cepa viral de referencia KOS) (**HSV-1 KOS**), como de células VERO infectadas con HSV-2 (cepa de referencia G) (**HSV-2 G**). Se incluyeron dos controles negativos (**sin infectar** y **(-)1rio**). Control negativo *sin infectar*: anticuerpos 14F5F6 de captura y detección sobre un extracto de células sin infectar, Control negativo *(-)1rio*: sólo anticuerpo de detección evaluado sobre extracto de HSV-2 sin anticuerpo de captura ((-)1rio). Adicionalmente el

anticuerpo 14F5F6 se ensayó contra 500 ng de las proteínas recombinantes VP21 de HSV-1 (**VP21-1**) y VP21 de HSV-2 (**VP21-2**), producidas en *E. coli* y purificadas.

Figura 3: Detección de antígenos de aislados clínicos de HSV-1 y HSV-2 por el anticuerpo 14F5F6 en ELISA de tipo *sandwich*. Se evaluó la reactividad en ensayo ELISA tipo *sándwich*, del anticuerpo de la invención empleando anticuerpo del clon del hibridoma 14F5F6 contra extracto proteico de células VERO inoculadas con aislados clínicos de HSV-1 y HSV-2 desde las cuales se extrajo proteínas (**HSV-1** y **HSV-2**). Se incluyeron dos controles negativos (**sin infectar y (-)1rio**). Control negativo *sin infectar*: anticuerpos 14F5F6 de captura y detección sobre un extracto de células sin infectar, Control negativo *(-)1rio*: sólo anticuerpo de detección evaluado sobre extracto de HSV-2 sin anticuerpo de captura (*(-)1rio*). Adicionalmente el anticuerpo 14F5F6 se ensayó contra 500 ng de las proteínas recombinantes VP21 de HSV-1 (**VP21-1**) y VP21 de HSV-2 (**VP21-2**), producidas en *E. coli* y purificadas.

Figura 4: Detección de antígenos de HSV-1 y HSV-2 por el anticuerpo 14F5F6 por microscopía de fluorescencia. Ensayos de inmunofluorescencia con muestras de células infectadas con HSV-1 y HSV-2 o no-infectada, utilizando el anticuerpo 14F5F6. Células VERO fueron infectadas con HSV-1 o HSV-2, fijadas con acetona e incubadas con el anticuerpo 14F5F6 en cámara húmeda. Luego de lavados con solución salina, la muestra fue incubada con un anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado al fluoróforo FITC. Fila1: células sin infectar, Fila 2: células infectadas con HSV-1 (KOS), Fila 3: células infectadas con HSV-2 (G). Las columnas corresponden a los distintos anticuerpos utilizados para evaluar infección o reactividad no-específica. Columna 1: kit comercial de Millipore® DFA® de Light Diagnostics® número de catálogo 3291; Columna 2: anticuerpo 14F5F6. Las células que se ven blancas, corresponden a células detectadas como infectadas con HSV-1 o HSV-2. Como se muestra en la figura, el anticuerpo 14F5F6 mostró capacidad de reconocer células infectadas con HSV-1 y HSV-2 de forma similar o mejor que el kit comercial de Millipore® DFA® de Light Diagnostics®.

Figura 5: Detección de antígenos de HSV-1 y HSV-2 por el anticuerpo 14F5F6 por citometría de flujo. Monocapas de células HeLa fueron infectadas con **A.** virus herpes simple 1 (**HSV-1 KOS**) o **B.** virus herpes simple 2 (**HSV-2 G**). Las células infectadas se soltaron desde la placa de cultivo con tripsina y fueron lavadas con solución salina y enseguida fijadas con paraformaldehído al 2% en solución salina. Luego, las células fueron permeabilizadas con saponina 0,5% en solución salina e incubadas con anticuerpo 14F5F6. Luego, fueron lavadas con solución salina e incubadas con

anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado al fluoróforo alofococianina (APC). Enseguida, las células fueron lavadas una vez más con solución salina y resuspendidas en la misma solución para proceder a medición por citometría de flujo. Los controles negativos corresponden a 1. Células sin infectar a las cuales se le aplicó anticuerpo 14F5F6 y luego anticuerpo secundario (**sin infectar**) y 2. Células sin infectar a las cuales se le aplicó solo anticuerpo secundario sin anticuerpo 14F5F6 (**(-)1rio**). Como control positivo para detectar la infección por HSV-1 (KOS) se utilizó el anticuerpo primario anti-gB (**Ac anti-gB, panel A**). Como control positivo para detectar la infección por HSV-2 (G) se utilizó el anticuerpo primario anti-gB (**Ac anti-gD, panel B**). En la figura se indican los porcentajes de células que presentan una intensidad de fluorescencia asociado a la detección de antígeno de HSV superior al de células sin infectar tratadas con el anticuerpo 14F5F6.

Descripción Detallada de la invención

La presente invención provee un anticuerpo monoclonal que es capaz de reconocer tanto a HSV-1 como a HSV-2, que se une específicamente a la proteína VP21 de la cápside del HSV-1, y; convirtiendo a este nuevo anticuerpo, en una alternativa útil para la detección, diagnóstico y tratamiento específico de la infección causada por los virus herpes simple 1 y/o 2 (HSV).

El anticuerpo monoclonal o fragmentos del mismo que son parte de esta invención, han sido producidos mediante la inmunización de ratones empleando como antígeno, la proteína de la cápside VP21 codificada por el gen *UL26* del virus herpes simple (HSV-1; herpes simplex virus type 1) cuya secuencia ha sido optimizada para incrementar su expresión en *E. coli* y que corresponde la secuencia SEQ ID N°17. Este anticuerpo monoclonal se obtuvo de una línea celular entre varios hibridomas monoclonales obtenidos contra VP21 de HSV-1, y que aquí designamos como 14F5F6, de isotipo IgG1,K, y que es capaz de reconocer de manera específica, los virus HSV-1 y HSV-2.

De manera preferida, el anticuerpo monoclonal de la invención, es útil para reconocer con alta especificidad el virus herpes simple de tipo 1 (HSV-1) y virus herpes simple del tipo 2 (HSV-2).

A modo de resumen, un anticuerpo monoclonal es un tipo de anticuerpo homogéneo que se caracteriza por reconocer específicamente un solo antígeno y 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 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 anticuerpo monoclonal de la invención puede emplearse completo, 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-VP21 de HSV-1.

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 el anticuerpo de la invención.

De este modo la invención apunta a un anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que se reconoce específicamente el virus del herpes simple de tipo 1 (HSV-1) y el virus del herpes simple de tipo 2 (HSV-2), donde dicho anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada cuyos CDR1, CDR2 y CDR3 tiene secuencias aminoacídicas que

tienen al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con las SEQ ID No:3, SEQ ID No:4 y SEQ ID No:5, respectivamente, y tiene una región variable de la cadena liviana cuyos CDR1, CDR2 y CDR3, tiene secuencias que tienen al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con las SEQ ID No:6, SEQ ID No:7 y SEQ ID No:8, respectivamente. Más específicamente 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:1 y tiene una región variable de la cadena liviana con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID No:2. O de forma alternativa, se puede definir que el anticuerpo en 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:9 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:10. O dicho anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada cuyos CDR1, CDR2 y CDR3 están codificados en una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 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, y tiene una región variable de la cadena liviana cuyos CDR1, CDR2 y CDR3, están codificados en secuencias nucleotídicas que tiene al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 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. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que reconoce específicamente el virus del herpes simple, puede ser un anticuerpo humanizado o quimérico.

Para el experto en la técnica será evidente que las secuencias nucleotídicas pueden tener una mayor variabilidad, debido a la degeneración del código genético.

Adicionalmente la invención apunta a una composición farmacéutica el tratamiento y/o profilaxis de la infección causada por HSV-1 y/o HSV-2 que comprende el anticuerpo monoclonal de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto la invención apunta a un método de detección de virus HSV-1 y/o HSV-2 en una muestra que comprende contactar la muestra con el anticuerpo monoclonal de la invención o un fragmento de este y detectar la unión del anticuerpo con el antígeno. La técnica utilizada para detectar la unión del anticuerpo con el antígeno puede corresponder a ELISA, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, citometría de flujo, cell sorter, inmunoprecipitación, Western blot, o cualquier otra disponible en la técnica. En una realización el anticuerpo de la invención o fragmento

de él se encuentra conjugado con un marcador que permite su detección. Donde el marcador se selecciona del grupo compuesto por fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales, enzimas, o cualquier otro disponible en la técnica. En una realización el anticuerpo de la invención o fragmento de él se encuentra inmovilizado en un soporte sólido; tal como nitrocelulosa, celulosa, polietileno y nylon.

En aún otro aspecto, la invención apunta a un método de tratamiento o profilaxis de una infección por virus HSV-1 y/o HSV-2 que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable, así como excipientes y auxiliares de formulación para distintas formas farmacéuticas. Donde las formas farmacéuticas pueden ser solución inyectable, liofilizados para preparar soluciones inyectables u cualquier otra que exista en la técnica.

Donde dicha composición se administra por vía intramuscular, intravenosa, u otra.

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

Ejemplo 1: Obtención de un anticuerpo anti-VP21 de HSV-1.

Tal como se ha mencionado a lo largo de esta descripción, para el desarrollo del anticuerpo de la invención, se eligió como antígeno a reconocer, a la proteína VP21 de HSV-1. Para ello, el gen viral codificante para esta proteína viral, de la cápside de HSV-1 el gen *UL26* de HSV-1, se obtuvo por síntesis química, empleando codones optimizados para favorecer su posterior expresión en cepas de *E. coli* KRX, desde donde se purificó para ser usado como antígeno en el proceso de inmunización acorde se describe más adelante.

La expresión de la proteína VP21 de HSV-1 recombinante a usar como antígeno, fue analizada inicialmente por medio de técnicas de amplio dominio técnico como electroforesis en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y transferencias de *Western blot* para su posterior reconocimiento con un anticuerpo monoclonal contra el dominio 6x-His presente en las proteínas recombinantes antigénicas.

VP21 de HSV-1 purificada, fue enseguida, concentrada con metodologías conocidas de centricones y bolsas de diálisis, obteniendo cantidades sobre el miligramo por mililitro para la proteína viral. De esta forma, se logró obtener VP21 de HSV-1 en un alto grado de pureza y en cantidades apropiadas para ser empleada en el proceso de inmunización

y producción de anticuerpos monoclonales específicos contra esta proteína recombinante.

Como resultado de la inmunización con VP21 de HSV-1, codificada por el gen *UL26* modificado acuerdo a esta invención, se obtuvieron cinco líneas de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra VP21 de HSV-1, entre ellas, se cuenta la línea 14F5F6; esta última que fue escogida como la productora del anticuerpo de esta invención, dado su mayor eficiencia en la unión y detección de HSV-1 y de HSV-2, tal como se demuestra más adelante.

La especificidad del anticuerpo obtenido por ambas líneas de hibridomas seleccionadas fue evaluada tanto por ensayos de ELISA directo, de ELISA tipo *sandwich* y por *Western blot*, utilizando como control positivo, la proteína recombinante que se utilizó para la producción de este anticuerpo. El isotipo, así como el tipo de cadena liviana que poseen el anticuerpo obtenido en esta invención es IgG1,K para la línea 14F5F6.

Ejemplo 2: Evaluación del anticuerpo monoclonal en ensayos de ELISA tipo directo con antígeno extraído de cultivos infectados con virus herpes simple (cepas referencia de laboratorio).

Para evaluar la especificidad del anticuerpo de la invención se realizó un ensayo ELISA directo sobre antígenos virales extraídos desde cultivos de células epiteliales infectadas con virus herpes simple 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2). Se utilizó un cultivo de células VERO (ATCC® CCL-81™ *Cercopithecus aethiops, kidney epithelial cells*), las que fueron infectadas con HSV-1 (cepa viral de referencia KOS) o HSV-2 (cepa viral de referencia G). Ambos grupos de células fueron infectas con el virus; luego se procedió a su cosecha por centrifugación. El sedimento celular obtenido fue utilizado para extracción proteica total mediante buffer RIPA (aproximadamente 100-150 µL de buffer por cada 10⁷ células). Luego, la concentración de proteína se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico con BCA. Una vez conocidas las concentraciones de proteína total se activaron las placas de ELISA con 50 µL de los extractos de proteínas a una concentración de 10 µg/ml por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se lavaron 3 veces con 100 µL de PBS/Tween al 0,05% y luego 5 veces con PBS sin Tween. Posteriormente, se procedió al bloqueo de todos los pocillos de la placa con una solución de suero fetal bovino al 5% a temperatura ambiente. Luego se repitió el esquema de lavados anteriores sobre las placas y se incubó el anticuerpo primario de la invención 14F5F6 por dos horas a temperatura ambiente (5 µg por pocillo). Luego, se repitió el esquema de lavados anteriores sobre las placas y se incubó con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a HRP (peroxidasa de rábano). Como control

negativo se agregó solo anticuerpo secundario sobre extracto de células infectadas con HSV-2. Posteriormente se procedió al revelado con una solución PCB (buffer citrate 35 mM, phosphate 67 mM, pH 5.0), TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) 0,1 mg/ml y H₂O₂ 0,02% concentración final. Se dejó proceder la reacción enzimática hasta previo saturación. Para detener la reacción se agregan 10 µL de una solución de ácido sulfúrico 2 N y se procedió a la lectura de absorbancia en lector de ELISA a 450 nm en un equipo Multiskan EX Thermo Labsystem. Los resultados se muestran en la Figura 1.

En estos ensayos se observó que el anticuerpo de la invención 14F5F6 reaccionó de forma significativa contra extractos de células infectadas con cepas de referencia de virus herpes simple HSV-1 (KOS) y HSV-2 (G). El anticuerpo monoclonal ensayado 14F5F6 reaccionó contra HSV-1 y HSV-2.

Ejemplo 3: Evaluación del anticuerpo monoclonal 14F5F6 en ensayos de ELISA tipo *sandwich* con antígeno extraído de cultivos infectados con virus herpes simple (cepas referencia de laboratorio).

Se evaluó la reactividad del anticuerpo de la invención contra 1 µg de extracto proteico de células VERO infectadas con HSV-1 (cepa viral de referencia KOS) o con HSV-2 (cepa viral de referencia G) y contra las proteínas recombinantes VP21 de HSV-1 y de HSV-2, obtenidas en *E. coli* y purificadas. La placa de ELISA fue activada con 50 µl del anticuerpo 14F5F6 como anticuerpo de captura a una concentración de 12 ng/µL a temperatura ambiente. Enseguida se eliminó el anticuerpo de captura y se procedió al bloqueo de todos los pocillos de la placa con una solución de suero fetal bovino al 5% a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la placa 3 veces con 100 µL de PBS/Tween al 0,05% y luego 5 veces con PBS sin Tween. Después, se aplicó 1 µg del extracto proteico y se incubó la placa a temperatura ambiente. Enseguida, se agregaron 50 µl del anticuerpo de detección 14F5F6 conjugado a HRP (peroxidasa de rábano) a 6 ng/µL. Se incubó por 30 min y se lavó previo a adicionar la solución de revelado. Posteriormente se procedió al revelado con una solución PCB (buffer citrate 35 mM, phosphate 67 mM, pH 5.0), TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) 0,1 mg/ml y H₂O₂ 0,02% concentración final. Se dejó proceder la reacción enzimática hasta previo saturación. Para detener la reacción se agregan 10 µL de una solución de ácido sulfúrico 2 N y se procedió a la lectura de absorbancia en lector de ELISA a 450 nm en un equipo Multiskan EX Thermo Labsystem. Los resultados se muestran en la Figura 2, donde queda en evidencia la capacidad del anticuerpo monoclonal de la invención (14F5F6) para reconocer extractos proteicos infectados tanto con HSV-1 como a HSV-2, así como un control que demuestra su reconocimiento de la proteína VP21 de ambos virus.

Ejemplo 4: Evaluación del anticuerpo monoclonal 14F5F6 en ensayos de ELISA tipo *sandwich* con cepas de HSV obtenidas desde muestras clínicas.

Para evaluar la eficacia del anticuerpo de la invención en reconocer aislados clínicos de HSV, se trabajó con cepas de HSV obtenidas desde muestras clínicas. Para esto se obtuvieron aislados clínicos de pacientes con infecciones de HSV-1 o HSV-2, los que fueron cultivados (amplificados) en células VERO, permisivas para los virus HSV-1 y HSV-2, desde las cuales se extrajo proteínas. La placa de ELISA fue activada con 50 μ L del anticuerpo 14F5F6 como anticuerpo de captura a una concentración de 12 ng/ μ L a temperatura ambiente. Enseguida se eliminó el anticuerpo de captura y se procedió al bloqueo de todos los pocillos de la placa con una solución de suero fetal bovino al 5% a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la placa 3 veces con 100 μ L de PBS/Tween al 0,05% y luego 5 veces con PBS sin Tween. Después, se aplicó 1 μ g del extracto proteico y se incubó la placa a temperatura ambiente. Enseguida, se agregaron 50 μ L del anticuerpo de detección 14F5F6 conjugado a HRP (peroxidasa de rábano) a a 6 ng/ μ L. Se incubó por 30 min y se lavó previo a adicionar la solución de revelado. Posteriormente se procedió al revelado con una solución PCB (buffer citrate 35 mM, phosphate 67 mM, pH 5.0), TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) 0,1 mg/ml y H₂O₂ 0,02% concentración final. Se dejó proceder la reacción enzimática hasta previo saturación. Para detener la reacción se agregan 10 μ L de una solución de ácido sulfúrico 2 N y se procedió a la lectura de absorbancia en lector de ELISA a 450 nm en un equipo Multiskan EX Thermo Labsystem. Los resultados se muestran en la Figura 3, donde queda en evidencia la capacidad del anticuerpo monoclonal de la invención (14F5F6) para reconocer extractos proteicos infectados tanto con aislados clínicos de HSV-1 como a HSV-2, así como un control que demuestra su reconocimiento de la proteína VP21 de ambos virus.

Ejemplo 5: Ensayos de inmunofluorescencia con muestras de células infectadas con HSV, utilizando el anticuerpo desarrollado contra VP21 de HSV-1.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo de la invención 14F5F6 y se comparó con un kit comercial. Células VERO fueron infectadas con HSV-1 o HSV-2 y luego soltadas desde las placas con tripsina, lavadas con solución salina y dispuestas sobre un portaobjeto hasta secar la muestra. Enseguida se aplicaron 50 μ L de acetona para fijar las células y luego de realizar un lavado con solución salina se aplicó el anticuerpo 14F5F6 (12 ng/ μ L) en cámara húmeda. Luego de lavados con solución salina, la muestra fue incubada con un anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado al fluoróforo FITC. En la figura 4, las filas corresponden a condiciones

de tratamiento. Fila 1: células sin infectar, Fila 2: células infectadas con HSV-1 (KOS), Fila 3: células infectadas con HSV-2 (G). Las columnas corresponden a los distintos anticuerpos utilizados para evaluar infección o reactividad no-específica. Columna 1: kit comercial de Millipore® DFA® de Light Diagnostics® número de catálogo 3291; Columna 2: anticuerpo 14F5F6. Las células que se ven blancas (claras), corresponden a células detectadas como infectadas (infección positiva) con HSV-1 o HSV-2. Como se muestra en la figura 4, el anticuerpo 14F5F6 mostró capacidad de reconocer células infectadas con HSV-1 y HSV-2 de forma similar o mejor que el kit comercial de Millipore® DFA® de Light Diagnostics®. Con ello, nuevamente se confirma que el anticuerpo de la invención 14F5F6 es capaz de reconocer células infectadas con HSV-1 y/o HSV-2, también en ensayos de inmunofluorescencia.

Ejemplo 6: Citometría de células infectadas con virus HSV-1 y marcadas intracelularmente con el anticuerpo 14F5F6 de la invención.

Monocapas de células HeLa (ATCC #CCL-2, *Homo sapiens*, cervix) fueron infectadas con virus herpes simple 1 (cepa KOS) o virus herpes simple 2 (cepa G). Posterior a la infección, las células fueron soltadas desde la placa con tripsina y separadas por centrifugación. El sedimento celular resultante fue resuspendido en una solución de salina con paraformaldehído al 2% e incubado para inactivación del virus. Posteriormente, las células fueron lavadas con solución salina, centrifugadas y resuspendidas en una solución de solución salina/Saponina al 0,5% con el propósito de permeabilizar las células ya fijadas. Después de 15 minutos de incubación, las células fueron centrifugadas, y resuspendidas en una solución salina/Saponina al 0,5% más el anticuerpo primario 14F5F6, agregando 2 µg totales de anticuerpo por cada 10^6 células en un volumen de 100 µL. Después de incubación a 4°C, se lavaron las células con solución salina. Posteriormente, se resuspendieron las células en una solución que contenía un anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado a aloficocianina (APC) y se observó la muestra en un citómetro de flujo FACS-Canto II, BD. Con el fin de corroborar la especificidad del anticuerpo se realizó el protocolo más arriba con anticuerpo 14F5F6 y anticuerpo secundario sobre células sin infectar. En el gráfico de la Figura 5 se expresa el porcentaje de intensidad de fluorescencia asociado a la detección de antígeno versus el mismo anticuerpo contra células no infectadas. El anticuerpo de la invención mostró especificidad para células infectadas y permitió discriminar células infectadas de células no-infectadas.

Ejemplo 7: Secuenciación del Anticuerpo de la invención.

Se procedió a la secuenciación del anticuerpo de la invención 14F5F6, producido por el hibridoma 14F5F6. Las secuencias proteicas de la cadena pesada se muestra en la SEQ ID N°1, y la de la cadena liviana en la SEQ ID N°2, y las secuencias aminoacídicas para los CDRs están identificados en:

- SEQ ID N°3 para CDR1, Cadena pesada;
- SEQ ID N°4 para CDR2, Cadena pesada;
- SEQ ID N°5 para CDR3, Cadena pesada;
- SEQ ID N°6 para CDR1, Cadena liviana;
- SEQ ID N°7 para CDR2, Cadena liviana;
- SEQ ID N°8 para CDR3, Cadena liviana.

Mientras que las secuencias nucleotídicas codificantes para las regiones variables de cada secuencia se muestran en las SEQ ID N°9 para la cadena pesada y en las SEQ ID N°10 para la cadena liviana, y las secuencias nucleotídicas para los CDRs están identificados en:

- SEQ ID N°11 para CDR1, Cadena pesada;
- SEQ ID N°12 para CDR2, Cadena pesada;
- SEQ ID N°13 para CDR3, Cadena pesada;
- SEQ ID N°14 para CDR1, Cadena liviana;
- SEQ ID N°15 para CDR2, Cadena liviana;
- SEQ ID N°16 para CDR3, Cadena liviana.

Pliego de Reivindicaciones

1. Anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que se reconoce específicamente el virus del herpes simple de tipo 1 (HSV-1) y el virus del herpes simple del tipo 2 (HSV-2) CARACTERIZADO porque dicho anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada cuyos CDR1, CDR2 y CDR3 tienen secuencias aminoacídicas con al menos un 95% de identidad con las SEQ ID No:3, SEQ ID No:4 y SEQ ID No: 5, 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% de identidad con las SEQ ID No:6, SEQ ID No:7 y SEQ ID No:8 , respectivamente.
2. Anticuerpo monoclonal o un fragmento de este, de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque dicho anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada cuyos CDR1, CDR2 y CDR3 son codificados por secuencias que tienen al menos un 90% de identidad con las SEQ ID No:11, SEQ ID No:12 y SEQ ID No:13, respectivamente, y tiene una región variable de la cadena liviana cuyos CDR1, CDR2 y CDR3, son codificados por secuencias que tienen al menos un 90% de identidad con las SEQ ID No:14, SEQ ID No:15 y SEQ ID No:16, respectivamente.
3. Anticuerpo monoclonal o un fragmento de este, de acuerdo a la reivindicación 1 CARACTERIZADO porque es específico contra la proteína VP21 de la cápside del HSV-1 y HSV-2.
4. Anticuerpo monoclonal o un fragmento de este, de acuerdo a la reivindicación 1 CARACTERIZADO porque el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o quimérico.
5. Composición farmacéutica para el tratamiento y/o profilaxis de la infección causada por HSV-1 y/o HSV-2 CARACTERIZADA porque comprende el anticuerpo monoclonal o un fragmento de este de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
6. Método de detección de virus HSV-1 y/o HSV-2 en una muestra CARACTERIZADO porque comprende contactar la muestra con el anticuerpo monoclonal o un

fragmento de este de la reivindicación 1 y detectar la unión del anticuerpo con el antígeno

7. Método de acuerdo a la reivindicación 6 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*.
8. Método de acuerdo a la reivindicación 6, CARACTERIZADO, porque el anticuerpo o fragmento de él de acuerdo con la reivindicación 1, se encuentra conjugado con un marcador que permite su detección.
9. Método de acuerdo a la reivindicación 8 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.
10. Método de acuerdo a la reivindicación 8 CARACTERIZADO, porque el anticuerpo o fragmento de él se encuentra inmovilizado en un soporte sólido.
11. Método de acuerdo a la reivindicación 10 CARACTERIZADO porque el soporte sólido se escoge entre nitrocelulosa, celulosa, polietileno y nylon.
12. Método de acuerdo a la reivindicación 6 CARACTERIZADO, porque la muestra puede corresponder a hisopado oral, de piel, de ojos, de mucosas, líquido encéfalo-raquídeo, o cualquier otro tipo de muestra que se considere apropiada.
13. Método de tratamiento o profilaxis de una infección por virus HSV-1 y/o HSV-2 CARACTERIZADO porque comprende administrar la composición farmacéutica de la reivindicación 5.
14. Método de la reivindicación 13 CARACTERIZADO porque la composición se administra por vía intramuscular.

Figura 1

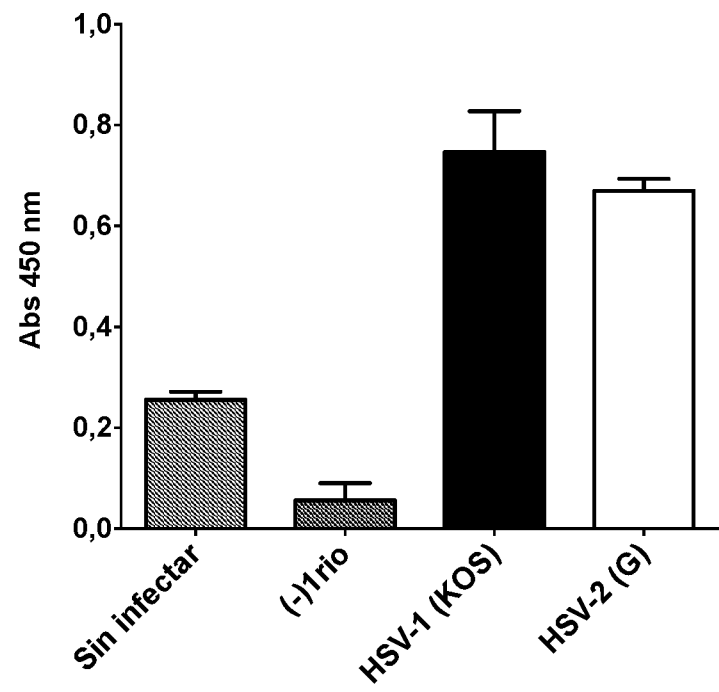


Figura 2

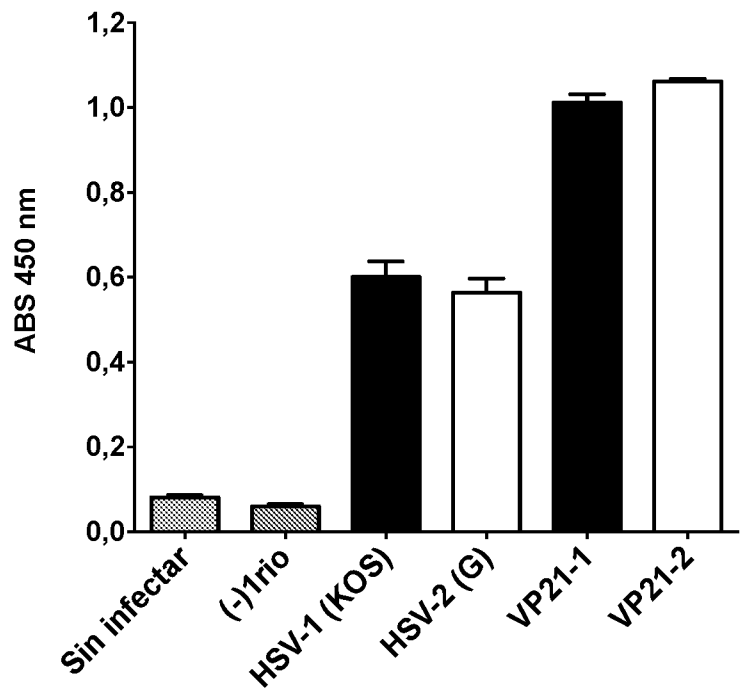


Figura 3

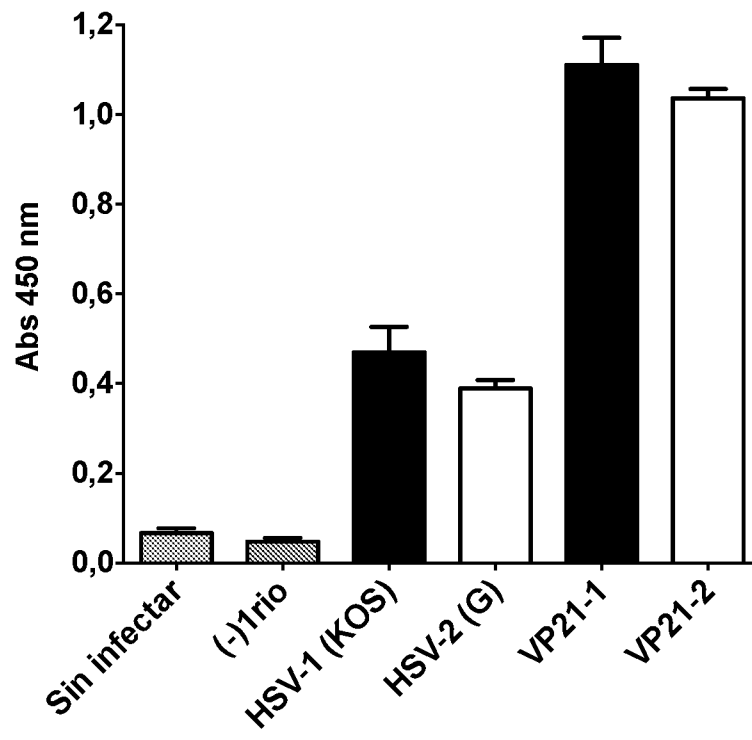


Figura 4

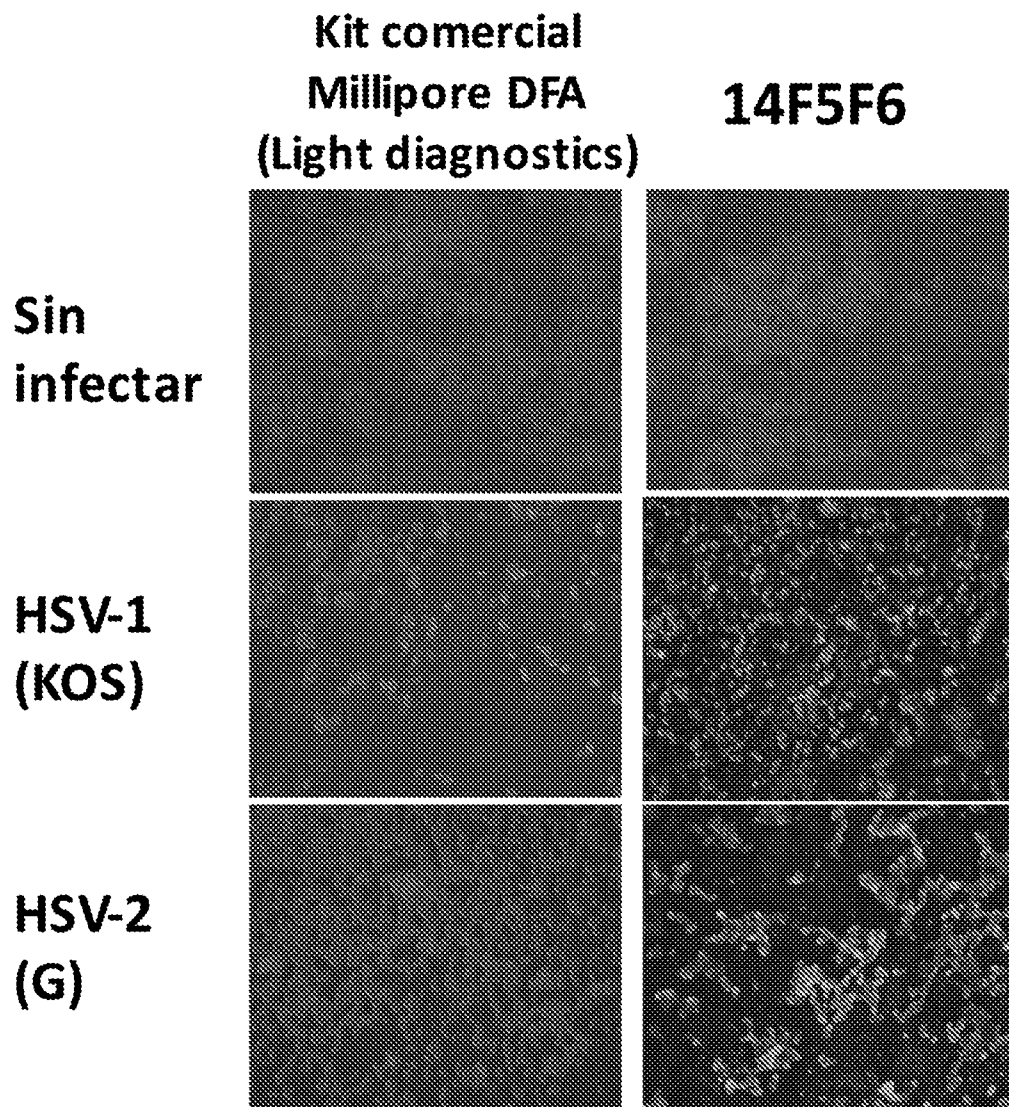
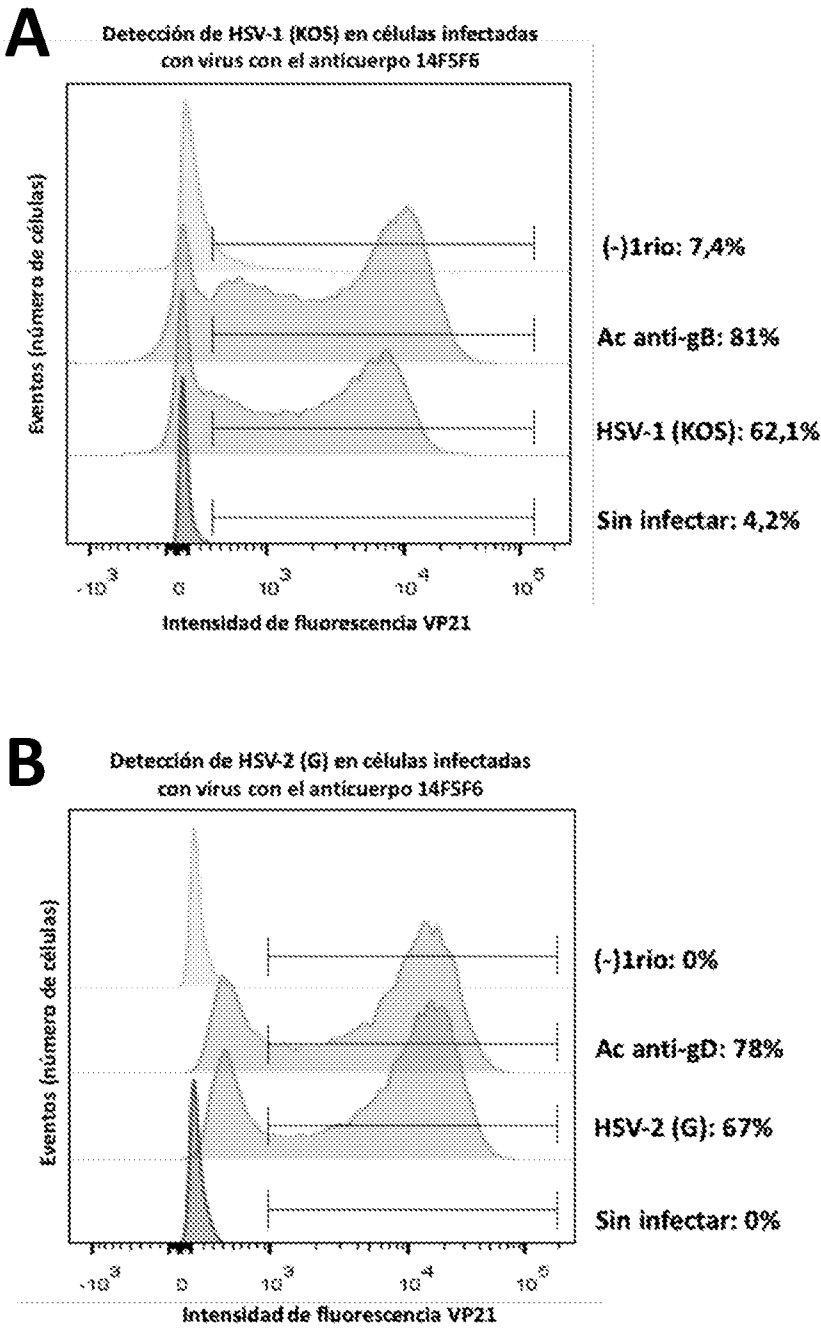


Figura 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2018/050074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

CIP: C07K16/08, A61K39/42, G01N33/577, A61P31/22 (2018.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

CIP: C07K16/08, A61K39/42, G01N33/577, A61P31/22 CPC: C07K16/087

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STN (CAPLUS, EMBASE), ESP@CENET, PATENTSCOPE, GOOGLE SCHOLAR, INAPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{x}{y}$	US 6156313 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 05 December 2000 Col. 4-10; claims.	$\frac{1, 2, 4-14}{3}$
$\frac{x}{y}$	US 2012/0282260 A1 (DCB-USA LLC) 08 November 2012 Paragraphs [0004]-[0011], [0041]-[0045], [0052]-[0055]; claims.	$\frac{1, 2, 4-14}{3}$
$\frac{x}{y}$	CA 2950489 A1 (HEIDELBERG IMMUNOTHERAPEUTICS GMBH, DE) 30 December de 2015 The whole document.	$\frac{1, 2, 4, 5, 13, 14}{3}$
y	KALANTARI-DEHAGHI, M. et al. Discovery of Potential Diagnostic and Vaccine Antigens in Herpes Simplex Virus 1 and 2 by Proteome-Wide Antibody Profiling. Journal of Virology, Mar 2012; 86(8): 4328-4339; DOI: 10.1128/JVI.05194-1 1. The whole document.	3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30/11/2018 30//November/2018

Date of mailing of the international search report

12/02/2019 12/February/2019

Name and mailing address of the ISA/

INAPI

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

Facsimile No.

Authorized officer

GARRIDO, Carolina

Telephone No.

N° de teléfono 56-2-28870551

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2018/050074

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHEAFFER, A. K. et al. Evidence for controlled incorporation of herpes simplex virus type 1 UL26 protease into capsids. J Viral. 2000 Aug;74(15):6838-48. Online ISSN: 1098-5514. DOI: 10.1128/JVI.74.15.6838-6848.2000 The whole document.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CL2018/050074

US 6156313 A	05-12-2000	AU1866895 (A) WO9518634 (A1)	01-08-1995 13-07-1995
US 2012/0282260 A1	08-11-2012	US8431118 (B2) BRPI0924072 (A2) CN102333789 (A) CN102333789 (B) EP2379590 (A1) EP2379590 (A4) EP2379590 (B1) KR20110129857 (A) KR101762827 (B1) MX2011007210 (A) TW201032824 (A) TWI454279 (B) TW201026331 (A) US2010172906 (A1) US8252906 (B2) WO2010078518 (A1) WO2010087813 (A1)	30-04-2013 28-03-2017 25-01-2012 12-10-2016 26-10-2011 20-03-2013 24-01-2018 02-12-2011 28-07-2017 24-10-2011 16-09-2010 01-10-2014 16-07-2010 08-07-2010 28-08-2012 08-07-2010 05-08-2010
CA 2950489 A1	30-12-2015	AU2015279212 (A1) AU2015279212 (A2) BR112016030422 (A2) CN106488931 (A) EP3160997 (A1) JP2017520572 (A) KR20170020423 (A) RU2017102387 (A) RU2017102387 (A3) SG11201610320R (A) US2017152304 (A1) WO2015197763 (A1)	01-12-2016 24-04-2017 24-10-2017 08-03-2017 03-05-2017 27-07-2017 22-02-2017 26-07-2018 26-07-2018 27-01-2017 01-06-2017 30-12-2015

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050074

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP: C07K16/08, A61K39/42, G01N33/577, A61P31/22 (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: C07K16/08, A61K39/42, G01N33/577, A61P31/22 CPC: C07K16/087

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, EMBASE), 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 ----- Y	US 6156313 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 05 de diciembre de 2000 Columnas 4-10; reivindicaciones.	1, 2, 4-14 ----- 3
X ----- Y	US 2012/0282260 A1 (DCB-USA LLC) 08 de noviembre de 2012 Párrafos [0004]-[0011], [0041]-[0045], [0052]-[0055]; reivindicaciones.	1, 2, 4-14 ----- 3
X ----- Y	CA 2950489 A1 (HEIDELBERG IMMUNOTHERAPEUTICS GMBH, DE) 30 de diciembre de 2015 Todo el documento.	1, 2, 4, 5, 13, 14 ----- 3
Y	KALANTARI-DEHAGHI, M. et al. Discovery of Potential Diagnostic and Vaccine Antigens in Herpes Simplex Virus 1 and 2 by Proteome-Wide Antibody Profiling. Journal of Virology, Mar 2012; 86(8): 4328-4339; DOI: 10.1128/JVI.05194-11. Todo el documento.	3

☒ 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.
30/11/2018 30/noviembre/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/CL2018/050074

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/CL2018/050074

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	SHEAFFER, A. K. et al. Evidence for controlled incorporation of herpes simplex virus type 1 UL26 protease into capsids. J Virol. 2000 Aug;74(15):6838-48. Online ISSN: 1098-5514. DOI: 10.1128/JVI.74.15.6838-6848.2000 Todo el documento.	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050074

Documento de patente citado en Informe de Búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de Familia	Fecha de Publicación
US 6156313 A	05-12-2000	AU1866895 (A) WO9518634 (A1)	01-08-1995 13-07-1995
US 2012/0282260 A1	08-11-2012	US8431118 (B2) BRPI0924072 (A2) CN102333789 (A) CN102333789 (B) EP2379590 (A1) EP2379590 (A4) EP2379590 (B1) KR20110129857 (A) KR101762827 (B1) MX2011007210 (A) TW201032824 (A) TWI454279 (B) TW201026331 (A) US2010172906 (A1) US8252906 (B2) WO2010078518 (A1) WO2010087813 (A1)	30-04-2013 28-03-2017 25-01-2012 12-10-2016 26-10-2011 20-03-2013 24-01-2018 02-12-2011 28-07-2017 24-10-2011 16-09-2010 01-10-2014 16-07-2010 08-07-2010 28-08-2012 08-07-2010 05-08-2010
CA 2950489 A1	30-12-2015	AU2015279212 (A1) AU2015279212 (A2) BR112016030422 (A2) CN106488931 (A) EP3160997 (A1) JP2017520572 (A) KR20170020423 (A) RU2017102387 (A) RU2017102387 (A3) SG11201610320R (A) US2017152304 (A1) WO2015197763 (A1)	01-12-2016 24-04-2017 24-10-2017 08-03-2017 03-05-2017 27-07-2017 22-02-2017 26-07-2018 26-07-2018 27-01-2017 01-06-2017 30-12-2015