

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 619**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013** **PCT/IB2012/056688**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013** **WO13076702**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2012** **E 12851478 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2784088**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno M2-1 del virus respiratorio sincicial (VRS)**

30 Prioridad:

25.11.2011 CL 30022011

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

06.03.2018

73 Titular/es:

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
(100.0%)
Avda. Libertador Bernardo O'Higgins, 340
Santiago, CL**

72 Inventor/es:

**KALERGIS PARRA, ALEXIS MIKES;
BUENO RAMIREZ, SUSAN MARCELA;
MORA ALARCON, JORGE EUGENIO y
GÓMEZ JOHNSON, ROBERTO SEBASTIÁN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 657 619 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno M2-1 del virus respiratorio sincicial (VRS)

Memoria descriptiva

Campo de la Invención

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que reconocen a la proteína M2-1 del virus respiratorio sincicial (VRS) humano, que son útiles para el desarrollo de métodos de diagnóstico de infección por VRS y para la producción de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento y/o profilaxis de la infección por VRS.

Antecedentes de la Invención

- 10 Las infecciones agudas del tracto respiratorio son la principal causa de hospitalizaciones y muertes pediátricas en todo el mundo (Bryce, Boschi-Pinto et al. 2005). Durante los meses fríos, las infecciones del tracto respiratorio causadas 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 (VRS), el adenovirus (ADV) y el virus de la gripe. Otro agente causal de infecciones del tracto respiratorio es el metapneumovirus (MPVh), un virus identificado recientemente y que causa infecciones
- 15 respiratorias graves en niños menores de dos años (van den Hoogen, Herfst et al. 2004), aunque su diagnóstico no está extendido. Sin embargo, el VRS es el principal agente causante de infecciones agudas del tracto respiratorio en lactantes de todo el mundo, provocando brotes graves en los meses invernales. Según la OMS, este virus infecta a 64 millones de personas anualmente, de las cuales 160.000 fallecen (www.who.int). La infección por este virus provoca una amplia gama de cuadros clínicos, que pueden ser leves como la rinitis o mucho más graves, como la
- 20 neumonía o la bronquiolitis, observándose las enfermedades más graves en lactantes, prematuros, niños con cardiopatías congénitas y niños inmunodeprimidos (Cabalka 2004). 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 al menos un episodio de infección por VRS (Bont, Versteegh et al. 2002). Debido a que esta infección no deja una memoria inmunológica adecuada, las reinfecciones son frecuentes, disminuyendo su gravedad a medida que
- 25 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 síntomas respiratorios graves. En Chile, durante los meses fríos (mayo-agosto) este virus es el causante del 70% de las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior que requieren hospitalización (Avendano, Palomino 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
- 30 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 sanitarios, entre las que se incluye 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 los que se produce el brote. El método de diagnóstico del VRS que suele utilizarse en los servicios de atención hospitalaria es un ensayo de diagnóstico basado en la detección de antígenos víricos mediante
- 35 inmunofluorescencia directa de hisopos nasofaríngeos. La limitación de ese ensayo está relacionada con la necesidad de tener personal formado para el procesamiento y análisis de las muestras y, además, con que los resultados de dicho ensayo no se obtienen de forma inmediata, dejando un periodo de tiempo en el que el paciente queda sin diagnosticar, aunque la infección continúa su curso. Ante tal problemática, el desarrollo de anticuerpos monoclonales eficaces, que puedan utilizarse para la creación de ensayos de detección del VRS alternativos, que
- 40 requieran una mínima formación y que sean rápidos de realizar (como, por ejemplo, los ensayos inmunocromatográficos), aparece como una alternativa necesaria para atender dicha necesidad, puesto que permiten el reconocimiento específico de antígenos víricos en muestras de pacientes infectados con VRS, requiriendo además una baja cantidad de muestra. De este modo, nuestra invención da como resultado un anticuerpo capaz de detectar bajas cantidades de antígenos de VRS de manera muy eficaz y efectiva, lo que
- 45 permite el desarrollo de un método alternativo de detección y diagnóstico que sea rápido, eficaz y certero para pacientes infectados con VRS, para establecer un tratamiento precoz y adecuado que tenga efecto en el desarrollo de la enfermedad. Además, la eficacia de nuestro anticuerpo permite proponer su uso para la preparación de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento y/o profilaxis de infección por VRS. El anticuerpo de la invención es específicamente un anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína M2-1 del VRS humano y que
- 50 secreta el hibridoma 8A4/G9.

El documento D. LI Y COL: "Association of Respiratory Syncytial Virus M Protein with Viral Nucleocapsids Is Mediated by the M2-1 Protein", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 82, no. 17, 25 de junio de 2008 (25-06-2008), páginas 8863-8870, desvela anticuerpos monoclonales contra la proteína M2-1 del VRS y su uso en la detección de esta proteína en células infectadas con el VRS mediante inmunofluorescencia.

- 55 El documento C. ORVELL ET AL: "Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies Directed against Five Structural Components of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup B", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 68, no. 12, 1 de diciembre de 1987 (1987-12-01), páginas 3125-3135, desvela un panel de anticuerpos

monoclonales contra proteínas del VRS, entre las que se incluyen las proteínas G, F, M, NP y P. Sin embargo, el documento no describe anticuerpos monoclonales contra la proteína M2-1.

Resumen de la invención

La presente invención hace referencia al uso de anticuerpos monoclonales específicos para el virus respiratorio sincicial (VRS). Concretamente, a un anticuerpo monoclonal IgG2A secretado por la línea celular de hibridoma 8A4/G9 dirigido específicamente al antígeno vírico M2-1, que está asociado a la nucleocápside del virus. Los anticuerpos pueden utilizarse para ensayos de detección y/o determinación de infección por VRS. Dichos anticuerpos se encuentran en estado puro y no contienen ningún otro material biológico contaminante. En la descripción del anticuerpo de la invención se usan indistintamente las expresiones proteína M2-1 y proteína M2.

La invención también proporciona métodos de diagnóstico y detección de antígenos víricos del VRS en muestras biológicas, utilizando los anticuerpos monoclonales producidos y secretados por células del hibridoma 8A4/G9, en ensayos tales como: ELISA, microscopia con inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, citometría de flujo, purificación celular (clasificación celular (*CellSorter*), por fluorescencia, mediante asociación a esferas magnéticas o cualquier método de separación que utilice el anticuerpo), inmunoprecipitación, transferencia de Western y cromatografía. Las muestras pueden ser células *in vitro* infectadas con VRS o muestras obtenidas de individuos que se sospecha que tienen infección por VRS. En el caso de muestras de un individuo, estas pueden ser muestras de 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 del virus respiratorio sincicial en muestras biológicas y cultivos celulares, poniendo en contacto estas muestras y cultivos con los anticuerpos monoclonales producidos y/o secretados por las líneas celulares del hibridoma 8A4/G9, fijados a cualquier tipo de soporte sólido, tal como, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa, nylon u otro soporte. La invención proporciona la oportunidad de desarrollar kits de detección rápida para el Virus Respiratorio Sincicial o similar, que contengan los anticuerpos producidos por el hibridoma 8A4/G9. Además, como método de detección, tratamiento, análisis y/o diagnóstico en muestras biológicas, también proporciona la posibilidad de incorporar cualquier tipo de molécula o sustrato que se una químicamente a los anticuerpos monoclonales secretados por el hibridoma 8A4/G9, tal como fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales, enzimas y/o cualquier elemento químico acoplado a los anticuerpos monoclonales secretado por el hibridoma 8A4/G9.

Descripción de la Figuras

Figura 1: Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina G secretada por el hibridoma 8A4/G9. **A.** Secuencia de nucleótidos del ARN mensajero que codifica la cadena pesada (IgGVH-8A4/G9, panel superior) y la cadena ligera (IgGκVL-8A4/G9, panel inferior), obtenida mediante secuenciación del ADN complementario preparado a partir de una muestra de ARN total purificado del hibridoma en activo crecimiento. **B.** Secuencia de aminoácidos deducida para la región variable de la cadena pesada (IgGVH-8A4/G9, panel superior) y cadena ligera (IgGκVL-8A4/G9, panel inferior).

Figura 2: Gráfico que muestra los resultados de un ensayo de detección del antígeno M2 del VRS mediante ELISA, utilizando el anticuerpo anti-M2 del clon 8A4/G9 (primera barra), anticuerpos policlonales anti-M2 producidos en conejo (segunda barra), sólo anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (tercera barra), anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con HRP (cuarta barra), anticuerpo anti-M2 del clon 8A4/G9 pero sin presencia de antígeno (quinta barra) y anticuerpos policlonales anti-M2 producidos en conejo pero sin presencia de antígeno (sexta barra). Se puede observar que el anticuerpo monoclonal anti-M2 del clon 8A4/G9 detecta de manera más eficaz el antígeno M2 que el anticuerpo policlonal producido en conejo.

Figura 3: Gráfico que representa el resultado obtenido de un ensayo de eficiencia del anticuerpo monoclonal anti-M2 del VRS del clon 8A4/G9 para detectar el antígeno a diferentes diluciones de anticuerpo y determinar su especificidad. El anticuerpo monoclonal anti-M2 (425 µg/ml) se utilizó a una dilución de 1/100 (concentración final de 4,25 mg/ml) (primera barra), a una dilución de 1/1.000 (concentración final 425 ng/ml) (segunda barra), a una dilución de 1/2.000 (concentración final 212,5 ng/ml) (tercera barra), y además, como control negativo, se utilizó la proteína M2 del MPVh como antígeno (cuarta barra), sólo anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (quinta barra) y control sin antígeno (sexta barra).

Figura 4: Gráficos que muestran los resultados de sensibilidad del anticuerpo monoclonal anti-M2 a una dilución de 1 en 100 (4,25 µg/ml) (figura 4A) y a una dilución de 1 en 1.000 (425 ng/ml) (figura 4B). En cada gráfico se muestra la capacidad del anticuerpo para detectar al antígeno en diferentes cantidades. Las cantidades de antígeno ensayadas fueron 1 µg (primera barra), 500 ng (segunda barra), 100 ng (tercera barra), 50 ng (cuarta barra), 25 ng (quinta barra), control sin antígeno (sexta barra), control de especificidad en el que se utiliza la proteína P8 de adenovirus como antígeno (séptima barra) y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (octava barra).

Figura 5: Gráficos que muestran datos de detección mediante citometría de flujo de células HEp-2 infectadas con VRS por el anticuerpo monoclonal anti-M2 (425 µg/ml), a una dilución de 1 en 3.000 (141,6ng/ml) (figura 5A) y a una dilución de 1 en 7.500 (56,6 ng/ml) (figura 5B). En cada gráfico se muestra la detección de antígeno en células infectadas (barras negras) y en células no infectadas (barras blancas), utilizando el anticuerpo monoclonal anti-M2 (primer par de barras), un control sólo con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón-FITC de ratón (segundo par de barras) y un control positivo con un anticuerpo anti-F de VRS (Bourgeois, Corvaisier et al. 1991)(tercer par de barras) Este último anticuerpo se utilizó a una dilución 1 en 1.000 en ambos ensayos.

Figura 6: La figura 6A imágenes de inmunofluorescencia de células HEp-2 infectadas y teñidas con el anticuerpo monoclonal anti-M2 de la invención. La figura 6B muestra imágenes de inmunofluorescencia de células HEp-2 infectadas y teñidas con el anticuerpo monoclonal anti-F de Millipore. En ellas, en la parte superior izquierda se muestra una imagen de la tinción sólo en el canal verde, que corresponde al marcador de M2 del VRS, la imagen superior derecha muestra la tinción sólo en el canal azul que corresponde al marcador nuclear y la imagen de la parte inferior muestra los dos canales juntos.

Figura 7: Gráficos que representan los resultados de la determinación del VRS mediante ensayo ELISA para el anticuerpo comercial anti-F (figura 7A) y para el anticuerpo monoclonal anti-M2-1 (figura 7B). En cada gráfico, se muestra la capacidad del anticuerpo para detectar al antígeno (primera barra), un control sin antígeno (segunda barra) y un control en el que se usa sólo anticuerpo secundario (tercera barra). La figura 7C corresponde a un gráfico que muestra los resultados de ambos anticuerpos. En ellos se observa que el anticuerpo monoclonal anti-M2-1 es capaz de detectar mejor partículas de virus que el anticuerpo comercial anti-F.

Figura 8: Gráficos que representan los resultados de la determinación del VRS mediante ensayo ELISA para el anticuerpo monoclonal anti-M2-1 con dilución 1 en 100 (4,25 ug/ml) (figura 8A), para el anticuerpo comercial anti-F con dilución 1 en 100 (10 µg/ml) (figura 8B) y para el anticuerpo anti-VRS de DHI con dilución 1 en 10 (figura 8C). En cada gráfico se muestra la capacidad del anticuerpo para detectar el antígeno (primera barra), un control sin antígeno (segunda barra) y un control en el que se usa sólo un anticuerpo secundario (tercera barra). El gráfico de la figura 8D muestra los resultados de los tres anticuerpos. Se observa que nuestro anticuerpo monoclonal fue el único capaz de reconocer partículas de virus.

Figura 9: Gráficos que muestran los resultados obtenidos mediante ensayo ELISA de tipo sándwich, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-M2 de la invención, con muestras de hisopos nasofaríngeos de pacientes previamente diagnosticados con o sin infección por VRS. Se muestran tres pacientes positivos al VRS (figuras 9A, 9B y 9C), un paciente positivo a MPVh (figura 9D), un paciente sano (figura 9E) y controles negativos sin muestra y sin anticuerpo de captura para determinar la señal específica (figura 9F). En las figuras 9A a 9E, la primera barra de los gráficos representa la detección del antígeno vírico utilizando el anticuerpo de detección (anticuerpo policlonal) a una dilución de 1 en 1.000; la segunda barra representa la detección del antígeno vírico utilizando el anticuerpo de detección a una dilución de 1 en 2.000; la tercera barra corresponde a un control en el cual no se ha utilizado el anticuerpo de detección; y la cuarta y quinta barra muestran el resultado del ensayo realizado sin activación de la placa con el anticuerpo monoclonal, pero utilizando el anticuerpo de detección en diluciones de 1 en 1.000 y 1 en 2.000, respectivamente. La figura 9F muestra un gráfico que corresponde a controles, donde las dos primeras barras muestran el resultado del ensayo sin muestra, a dos diluciones del anticuerpo de detección (1 en 1.000 y 1 en 2.000) y la tercera y cuarta barra muestran el resultado del ensayo sin muestra y sin anticuerpo de captura y con dos diluciones del anticuerpo de detección (1 en 1.000 y 1 en 2.000).

Descripción Detallada de la invención

La presente invención se refiere a la capacidad que posee el anticuerpo monoclonal IgG2A en el reconocimiento específico de un antígeno derivado de la proteína M2-1, el cual está asociado a la nucleocápside del Virus Respiratorio Sincicial (VRS).

Un anticuerpo monoclonal es un tipo de anticuerpo homogéneo que se caracteriza por ser capaz de reconocer específicamente un solo antígeno. Son producidos por una única célula híbrida (hibridoma), que es el 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 útil para la detección de moléculas que generan un gran interés científico, clínico e industrial. En la actualidad, los anticuerpos monoclonales se utilizan de manera generalizada, 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 enfermedades. 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, en la actualidad existen diversos kits de detección rápida, tal como el de la prueba del embarazo, que se basa en la determinación de los niveles de gonadotropina coriónica humana (GCh) en la orina utilizando anticuerpo anti GCh. Además, los anticuerpos monoclonales para uso terapéutico han cobrado gran relevancia. En la actualidad existen tratamientos

terapéuticos para distintas enfermedades que utilizan anticuerpos monoclonales comerciales tales como: alemtuzumad, gemtuzumab ozogamicina, rituximab, trastumab, etc. (Reichert).

El VRS es un virus de ARN con envoltura que pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*. Su ARN se transcribe en 10 ARNm, cada uno de los cuales codifica una proteína vírica, con excepción del ARNm de M2, el cual tiene dos marcos de lectura abiertos (ORF, *open reading frame*) solapados en 22 nucleótidos que codifican dos proteínas diferentes: el ORF-1 que codifica la proteína M2-1 y el ORF-2 que codifica la proteína M2-2. Las proteínas codificadas por los otros ARNm son la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína L, la proteína de la matriz (M), las proteínas NS1, NS2, SH, la proteína de fusión (F) y la proteína G. La proteína N se asocia al ARN genómico formando la nucleocápside, la proteína L es una ARN polimerasa asociada a la nucleocápside, la proteína F interacciona con las proteínas N y L, la proteína M es una proteína no glucosilada que se encuentra en la cara interna de la envoltura vírica, las proteínas NS1 y NS2 son proteínas no estructurales, y las proteínas SH, G y F forman parte de la envoltura vírica. Los kits de diagnóstico del 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 mismas proteínas (CL948-96, CN101130765, US6790611, WO2009088159, (Erdman y Anderson 1990), (Murray, Loney et al. 2001)). En la actualidad, no existen kits de diagnóstico del VRS o composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de la infección por VRS que utilicen anticuerpos que se unan a la proteína M2-1 del VRS.

M2-1 es un polipéptido con un peso molecular de 22 kD que actúa como un factor transcripcional, que impide la terminación prematura durante la transcripción y, de esa manera, facilita la lectura transcripcional en las uniones de genes y permite el acceso de la polimerasa del VRS a las unidades transcripcionales cadena abajo. Este proceso ocurre durante el ciclo de la replicación del VRS, donde la proteína M2-1, recién sintetizada, se asocia a la nucleocápside a través de su interacción con P. Además, se ha observado que la proteína M se asocia a la nucleocápside sólo en presencia de M2-1, y se ha sugerido que esta interacción permite apagar la actividad de transcriptasa del virus, presumiblemente para iniciar el ensamblaje y la gemación a través de la interacción con las glucoproteínas de la envoltura (Li, Jans et al. 2008). En la presente descripción las expresiones proteína M2-1 y proteína M2 se utilizan indistintamente.

A partir de nuestras investigaciones relacionadas con los efectos que tienen los antígenos víricos derivados del Virus Respiratorio Sincial (VRS) sobre el sistema inmunitario, hemos generado anticuerpos monoclonales murinos, específicos para la detección de antígenos del VRS, que presentan ventajas con respecto a los antígenos disponibles en el comercio. Específicamente, el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 8A4/G9 resultó ser de mucha utilidad para determinar la infección por el VRS en ensayos Inmunológicos realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando diversas técnicas de detección. Debido a esto, estos anticuerpos permiten disponer de una herramienta valiosa para la detección, el diagnóstico y/o la terapia de infección causada por el Virus Respiratorio Sincial en cualquier tipo de muestra biológica donde haya una carga de virus baja. Este anticuerpo monoclonal puede tener múltiples aplicaciones de uso diagnóstico y terapéutico, tales como su uso en técnicas de inmunotransferencia, inmunofluorescencia, inmunocromatografía, citometría de flujo, producción de formas farmacéuticas que lo comprenden, o cualquier otra aplicación que implique su utilización. El anticuerpo puede encontrarse unido a un marcador que permita su detección. Son ejemplos de posibles marcadores los que corresponden a fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales, enzimas y cualquier otro marcador apropiado para anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal de la invención puede encontrarse en su forma natural, tal como secretado por el hibridoma, o como alternativa, como fragmentos de unión a antígeno. Los fragmentos de unión a antígeno son fragmentos de 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-M2. Además, en el caso de la generación de composiciones que comprenden al anticuerpo de la invención, dichas composiciones pueden comprender el anticuerpo murino o el anticuerpo de la invención humanizado o quimérico. Esto es especialmente útil en composiciones para administración en seres humanos, como una forma de minimizar la posibilidad de que el sistema inmunitario del individuo tratado con la composición, genere una respuesta contra los anticuerpos de la invención.

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

Ejemplo 1: Determinación de la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de la región variable (VL, *variable light*) y la cadena pesada de la región variable (VH, *variable heavy*) de la inmunoglobulina anti M2-1 secretada por el hibridoma 8A4/G9.

El hibridoma 8A4/G9 se hizo crecer en medio DMEM con alto contenido en glucosa de GIBCO-BRL (Invitrogen, N° de catálogo SH30243.01) complementado con bicarbonato de sodio 3,7 g/l y suero bovino fetal al 10% (HyClone), a

37 °C con CO₂ al 10%. Cuando la densidad celular alcanzó las 700.000 células/ml, se recuperaron 3,5 x10⁶ células y a partir de estas células se realizó una purificación de ARN total utilizando Trizol (Invitrogen, N° de catálogo: 15596-018), como se ha sido descrito anteriormente (Chomczynski 1993). Utilizando el kit Impron II de Promega, se realizó la transcripción inversa (retrotranscripción) de 0,5 µg de ARN con ADN complementario y se utilizaron 2 µl de la reacción para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores proporcionados en el kit del conjunto de cebadores de Ig de Novagen (N° de catálogo 69831-3) siguiendo las instrucciones de los proveedores, en un termociclador Maxygene™ de Axygen. Se obtuvieron productos de PCR con los cebadores cuyas secuencias son: para la cadena pesada MulgVH5'-A: 5'GGGAATTCATGRASTTSKGGYTMARCTKGRITTT3' y MulgVH5'-F: 5'ACTAGTCGACATGAACTTYGGGYTSAGMTTGRTTT3'; para la cadena ligera MulgkV_L5'-B: 5'GGGAATTCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT 3' y MulgkV_L5'-C: 5'ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT3'. Los productos de la PCR se clonaron en el vector de clonación TOPO-TA pCr (Invitrogen, N° de catálogo K450001SC), siguiendo las instrucciones de los proveedores, y se secuenciaron por el servicio de secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile en un secuenciador Abiprism 3130xl (Applied Biosystem). La secuencia de ADN obtenida se observa en la figura 1A y la secuencia de aminoácidos deducida se observa en la figura 1B. La secuencia de aminoácidos se obtuvo utilizando el programa bioinformático Vector NTI (Invitrogen).

Ejemplo 2: Ensayo de detección de antígenos del VRS, especificidad del anticuerpo monoclonal M2-1 para antígenos del VRS purificados.

Este ensayo tiene como objetivo demostrar la especificidad de nuestro anticuerpo por antígenos víricos del VRS. La detección del antígeno se llevó a cabo mediante la técnica de ensayo ELISA directo, donde la placa de ELISA se activó con 200 ng de antígeno purificado durante 10 horas a 4 °C. Posteriormente, la placa se lavó una vez con PBS 1X/Tween al 0,02 %, y dos veces con PBS 1X, y después la placa se bloqueó durante 2 horas a temperatura ambiente con PBS1X/BSA al 3%. Se repitieron los lavados y después la placa se incubó con anticuerpo anti-M2 del VRS del clon 8A4/G9 (425 µg/ml) a una dilución de 1 en 100 en PBS 1X/BSA al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, los lavados se repitieron y la placa se incubó con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con la enzima peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase*, HRP) a una dilución de 1 en 2.000 en PBS 1X/BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron los lavados y la placa se reveló con 50 µl de tampón citrato/tetrametilbencidina (TMB) (3-3'-5-5'-tetrametilbenzidina, 1 mg/ml) a una dilución de 9:1 y H₂O₂ 1 ul/5ml. La reacción se detuvo añadiendo H₂SO₄ 2M y el resultado se leyó a una DO de 450 nm. Para la detección del antígeno, como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo anti-M2 del VRS del clon 8A4/G9 y después, como anticuerpo de detección (anticuerpo secundario), se utilizó anti-IgG de ratón marcado con HRP. Como control positivo, se utilizó un anticuerpo policlonal anti-M2 del VRS generado en conejo en nuestro laboratorio; en este caso, el anticuerpo secundario es un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con HRP. Para determinar que la reacción del anticuerpo secundario era específica en reconocer al anticuerpo primario y, además, que la señal obtenida no era provocada por la unión inespecífica del anticuerpo secundario con el antígeno vírico, se realizaron controles en los cuales se utilizó solamente anticuerpo secundario y no primario. Otro control para determinar que la reacción del anticuerpo primario es específica para el antígeno, consistió en el uso de anticuerpos sobre una placa de ELISA que no se había activado con el antígeno. Los resultados (figura 2) muestran que el anticuerpo monoclonal de la invención es capaz de reconocer 200 ng de antígeno purificado, siendo la señal incluso más fuerte que la del control positivo con anticuerpos policlonales.

Ejemplo 3: Ensayo para determinar la eficiencia del anticuerpo monoclonal para detectar antígenos víricos.

El ensayo se realizó para determinar la máxima dilución del anticuerpo monoclonal anti-M2 del VRS del clon 8A4/G9, que permitía la detección del antígeno vírico. Para esto, se utilizó la misma técnica del ensayo ELISA directo del ejemplo 2, pero en este caso la placa se activó con 100 ng de antígeno purificado y el anticuerpo anti-M2 (425 µg/ml) se utilizó a las diluciones de 1 en 100, 1 en 1.000 y 1 en 2.000. El control negativo fue la proteína M2 del MPVh como antígeno, para determinar que la reacción del anticuerpo es específica contra antígenos del VRS y no para antígenos de otros virus. Para determinar que la reacción del anticuerpo secundario era específica en reconocer al anticuerpo primario y, además, que la señal obtenida no era provocada por la unión inespecífica del anticuerpo secundario con el antígeno vírico, se realizaron controles en los que solo se utilizó el anticuerpo secundario y no el primario. Además, para determinar que la señal generada correspondía a la unión específica del anticuerpo con el antígeno, se realizó un control en el cual la placa de ELISA no se activó con antígeno antes de realizar la incubación con los anticuerpos. Los resultados muestran (figura 3) que a pesar de aumentar significativamente la dilución del anticuerpo, la señal obtenida se mantiene alta, y que el anticuerpo de la invención no reacciona inespecíficamente con la proteína M2 del MPVh. Esto indica que a baja concentración, nuestro anticuerpo monoclonal anti-M2, es capaz de detectar específicamente antígenos del VRS.

Ejemplo 4. Sensibilidad del anticuerpo monoclonal anti M2 contra antígenos del VRS.

Este ejemplo corresponde a un ensayo llevado a cabo para determinar la cantidad mínima de antígeno que puede detectar nuestro anticuerpo monoclonal. Se realizaron ensayos de ELISA directo, como se ha mencionado en los ejemplos anteriores. En este caso, la placa se activa con antígeno purificado utilizando diferentes cantidades de

antígeno: 1 ug, 500 ng, 100 ng, 50 ng y 25 ng. El mismo ensayo se realizó en dos grupos donde se evaluaron dos diluciones de anticuerpo anti-M2 (425 µg/ml): 1 en 100 (gráfico 4A) y 1 en 1.000 (gráfico 4B). Ambas diluciones se seleccionaron debido a que previamente habían mostrado una fuerte señal en el reconocimiento del antígeno purificado. Los dos grupos de ensayos incluyen un control en el que la placa de ELISA no se activa con antígeno (control sin antígeno), un control negativo con proteína P8 de Adenovirus para determinar la especificidad del anticuerpo por el antígeno del VRS y un control en el que solo se utiliza anticuerpo secundario. Los resultados muestran que las dos diluciones de anticuerpo generan una señal similar y, además, que el anticuerpo es capaz de detectar incluso 25 ng de antígeno puro con una señal bastante amplia.

Ejemplo 5. Detección de células infectadas con VRS mediante citometría de flujo, utilizando el anticuerpo anti-M2.

Este ensayo tiene como objetivo demostrar el amplio espectro de técnicas en el que se puede utilizar nuestro anticuerpo monoclonal. En los ejemplos anteriores, el anticuerpo monoclonal anti-M2 se utilizó en ensayos de ELISA y en este ejemplo, se evalúa la funcionalidad del anticuerpo de la invención para detectar la infección de células con el VRS, mediante citometría de flujo. Para esto, se utilizaron células HEp-2 infectadas con VRS y células no infectadas. El protocolo de tinción fue el siguiente: las células se permeabilizaron con PBS 1X/Saponina al 0,2 %, se tiñeron con el anticuerpo monoclonal anti-M2 del VRS del clon 8A4/G9 (425 µg/ml) durante 1 hora a 4 °C a dos diluciones: 1 en 3.000 (figura 5A) y 1 en 7.500 (figura 5B) en PBS 1X/BSA al 1%, después, las células se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 2.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 6 minutos, posteriormente se resuspendieron en el mismo tampón de permeabilización y se tiñeron con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con FITC diluido a 1 en 1.000 en PBS 1X/BSA al 1%. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X y se analizaron mediante citometría de flujo. Se incluyó un control en el que se utilizó sólo el anticuerpo secundario, para demostrar que la señal obtenida en el citómetro de flujo se debía a la unión del anticuerpo anti-IgG de ratón (anticuerpo secundario) marcado con FITC con el anticuerpo de la invención. Además, se incluyó un control positivo utilizando un anticuerpo anti-proteína F del VRS. Los datos obtenidos para ambas diluciones de anticuerpo fueron positivos, como se puede observar en la figura 5, donde podemos observar una notoria diferencia entre células infectadas y células no infectadas, concluyendo que nuestro anticuerpo es capaz de reconocer células infectadas por citometría de flujo. Obsérvese que, en el control positivo, el anticuerpo se utilizó a una dilución 1 en 1.000, lo cual es mucho mayor que la dilución utilizada con el anticuerpo de la invención. Eso explica por qué se obtiene una señal más fuerte con el control positivo que la que se obtiene con el anticuerpo monoclonal anti-M2.

Ejemplo 6. Detección de infección por VRS mediante inmunofluorescencia, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-M2.

Este ensayo se realizó para ampliar el espectro de técnicas que permiten detectar la infección por VRS, utilizando la invención desvelada. Se llevó a cabo un ensayo por microscopia de fluorescencia, donde células HEp-2 infectadas con VRS y no infectadas se tiñeron con anticuerpo monoclonal anti-M2. El protocolo utilizado fue el siguiente: las células se fijaron con PBS 1x/formaldehído al 4%/sacarosa 0,03M durante 10 minutos a 4 °C, después se lavaron con PBS 1X, se permeabilizaron con PBS 1X/Saponina al 0,2 % durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió el anticuerpo monoclonal anti-M2 de la invención (425 µg/ml) a una dilución de 1 en 200 (2,125 mg/ml) en PBS 1X/BSA al 1%/Saponina al 0,2 %/Sacarosa 0,03M durante 10 horas a 4 °C. Las muestras se lavaron con PBS 1X/Tween al 0,02% durante cinco minutos y después se realizaron dos lavados con PBS 1X. Se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con FITC a una dilución de 1 en 500 en PBS 1X/BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y los núcleos se tiñeron con Hoescht 33258 a una concentración 5 µg/ml durante 5 minutos a temperatura ambiente, y finalmente se lavaron con PBS 1X y se procesaron para su observación con un microscopio de fluorescencia. Los resultados obtenidos muestran (figura 6A) que el anticuerpo constituyente de la invención también es útil para reconocer células infectadas mediante inmunofluorescencia.

Como comparación, se llevó a cabo el mismo ensayo descrito anteriormente, pero con un anticuerpo monoclonal comercial específico para el antígeno de superficie F del VRS, muy utilizado en la actualidad (6B). El anticuerpo comercial utilizado es el anticuerpo murino que detecta la proteína F del VRS (anticuerpo anti-F, Millipore MAB8599Clon 131-2A). En resumen, células HEp-2 infectadas con VRS se tiñeron con el anticuerpo comercial a una dilución de 1:200 y después con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con FITC a una dilución de 1 en 500. Se observó que el anticuerpo comercial era capaz de detectar células infectadas con VRS.

Ejemplo 7: Ensayo comparativo entre el anticuerpo comercial anti-F de Millipore y el anticuerpo monoclonal anti-M2 del VRS del clon 8A4/G9.

Este ensayo corresponde a un análisis comparativo entre nuestro anticuerpo monoclonal anti-M2-1 y el anticuerpo monoclonal comercial específico para el antígeno de superficie F del VRS (anti-F Millipore) en un ensayo de ELISA. El anticuerpo anti-F es el mismo que el utilizado en el ejemplo 6, en el cual se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para detectar células infectadas con VRS. Para determinar la versatilidad de nuestro anticuerpo, en este ensayo se comparó nuestro anticuerpo anti-M2-1 con el anticuerpo anti-F de Millipore en una técnica distinta a la inmunofluorescencia. Para la realización de este ensayo, la placa de ELISA se activó con

partículas víricas (VRS) durante 10 horas a 4 °C. Posteriormente, la placa se bloqueó con gelatina de pescado al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente y después se lavó con PBS1 X/Tween al 0,02 % y se lavó dos veces con PBS 1X. A continuación, la placa se incubó con los dos anticuerpos a comparar, a una dilución de 1 en 1.000 durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se volvieron a realizar lavados y, posteriormente, la placa se incubó con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP a una dilución de 1 en 1.500. Finalmente, se repitieron los lavados y la placa ELISA se reveló con tampón citrato/TMB (9:1) y H₂O₂ (1 µl/5ml de solución). La reacción se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 2M. Los controles realizados en el ensayo corresponden a un control negativo en el cual no se utilizó muestra (la placa no se activó previamente con partículas víricas) para garantizar que la señal estaba determinada por el reconocimiento de antígenos del VRS, y otro control en el cual se utilizó sólo el anticuerpo secundario para determinar que el anticuerpo secundario no reconoce de por sí antígenos víricos. Los resultados de este ensayo se resumen en los gráficos de la figura 7. En ellos se observa que a una dilución de 1 en 1.000, el anticuerpo comercial no es capaz de detectar partículas víricas del VRS. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal anti-M2-1 es capaz de reconocer partículas víricas en dicha dilución. Es decir, el anticuerpo de la invención es eficaz incluso a diluciones en las que otros anticuerpos comerciales no son capaces de detectar el antígeno. Además, este ensayo demuestra que nuestro anticuerpo es eficaz en diversas técnicas de detección de antígenos.

Ejemplo 8: Ensayo comparativo entre el anticuerpo comercial anti-F de Millipore, el anticuerpo anti-VRS de DHI y el anticuerpo monoclonal anti-M2 del VRS del clon 8A4/G9.

Los anticuerpos comparados en este ensayo de ELISA fueron: el anticuerpo monoclonal anti-M2-1 de la invención, el anticuerpo monoclonal anti-F de Millipore (Mab8599) y el anticuerpo monoclonal anti-VRS de Diagnostic Hybrids (DHI, AcM VRS 01-013302). La elección de este último anticuerpo, para la comparación, se debe a que se utiliza de manera generalizada en la clínica para el diagnóstico de pacientes positivos a infección con el VRS y fue facilitado por el centro de investigación médica del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile.

El ensayo comparativo se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que el indicado en el ejemplo 7, salvo que las diluciones de los anticuerpos se modificaron. En este caso, se utilizó una dilución de 1 en 100 tanto para el anticuerpo monoclonal anti-F como para el anticuerpo monoclonal anti-M2-1, y para el anticuerpo anti-VRS de DHI se utilizó una dilución de 1 en 10, siguiendo la recomendación de *Diagnostic Laboratory*, ya que a esa dilución se obtiene una señal positiva para pacientes infectados con VRS. Al igual que en los ejemplos anteriores, se incluye un control sin muestra, para ver que la señal está determinada por el reconocimiento de antígenos de VRS y un control sólo con anticuerpo secundario, para determinar que nuestro segundo anticuerpo no reconoce de por sí antígenos víricos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8 y se puede observar que, a estas diluciones, los anticuerpos comerciales no muestran señal positiva para las partículas víricas (figuras 8B y 8C), no obstante el anticuerpo monoclonal anti M2-1 fue capaz de detectar partículas víricas (figura 8A). Es importante mencionar que para el diagnóstico de pacientes infectados por VRS, el uso del anticuerpo comercial anti-VRS de DHI está estandarizado exclusivamente para ensayos de microscopia de fluorescencia, razón por la cual, se podría explicar la no detección del VRS en un ensayo de ELISA. Por otra parte, la obtención de una señal positiva del anticuerpo monoclonal anti M2-1 muestra que este anticuerpo puede ser una nueva herramienta valiosa para el diagnóstico clínico de pacientes infectados con VRS utilizando la técnica de ELISA, actualmente no considerada. Además abre la posibilidad de utilizar este anticuerpo monoclonal para el desarrollo de un kit de inmunodiagnóstico.

Ejemplo 9: Diagnóstico clínico de muestras de pacientes infectados con VRS, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-M2-1 del VRS por ELISA.

Para verificar la capacidad del anticuerpo monoclonal, que constituye la patente, para diagnosticar o detectar pacientes positivos al VRS a partir de muestras clínicas de hisopos nasofaríngeos, se realizó un ensayo de ELISA. Las muestras clínicas se obtuvieron en el Centro de Investigación Médicas de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile, que fueron previamente diagnosticadas por inmunofluorescencia (método actualmente utilizado para el diagnóstico de dicha enfermedad). Se realizaron ensayos de ELISA de tipo sándwich con muestras de pacientes, donde se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-M2 del VRS para activar la placa en una dilución 1 en 350, después la placa se bloqueó con gelatina de pescado al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un lavado con PBS 1X/Tween al 0,02 % y dos con PBS 1X, y después se incubaron las muestras de hisopos nasofaríngeos durante 10 horas a 4 °C. Las muestras se lavaron nuevamente y se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-M2 del VRS durante 2 horas a temperatura ambiente, en dos diluciones: 1 en 1.000 y 1 en 2.000. A continuación, se realizaron lavados como se describió anteriormente y las muestras se incubaron con anticuerpo anti-IgG de conejo-HRP (diluido 1 en 2.000) y se reveló con tampón citrato/TMB (9:1) y H₂O₂ 1 µl/5 ml. Para detener la reacción, se añadió H₂SO₄ 2M. El ensayo se llevó a cabo en muestras de tres pacientes positivos al VRS (figuras 9A a 9C), un paciente positivo al MPVh (figura 9D), un paciente sano (figura 9E) y controles negativos sin muestra y sin anticuerpo de captura, para determinar que la señal obtenida es específica (figura 9F). Los resultados muestran que el anticuerpo anti-M2 es capaz de reconocer antígenos víricos específicos del VRS de hisopos nasofaríngeos. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal que define la invención puede utilizarse satisfactoriamente para detectar antígenos víricos del VRS en muestras de pacientes.

Los ejemplos descritos en esta memoria descriptiva demuestran la especificidad, eficiencia, sensibilidad y versatilidad que posee nuestro anticuerpo monoclonal anti-M2-1 del VRS secretado por la línea celular de hibridoma 8A4/G9. Sus características ventajosas con respecto a otros anticuerpos que se unen al VRS y que se encuentran disponibles en el comercio, hacen de nuestro anticuerpo una alternativa eficaz para múltiples usos tanto en la
 5 detección y/o identificación del VRS como para la generación de composiciones farmacéuticas que permitan el tratamiento y/o la profilaxis de la infección por VRS. Los ejemplos presentados en este documento constituyen una demostración de algunos de los usos del anticuerpo monoclonal anti-M2-1 del VRS, pero en ningún caso limitan el alcance de nuestra invención.

REFERENCIAS

- 10 www.who.int. Initiative for Vaccine Research (IVR), Acute Respiratory Infections (Update September 2009).

CL948-96, **Anticuerpos monoclonales humanos contra la proteína F del virus respiratorio sincicial (VRS), células que los producen; secuencias de ADN que los codifican; métodos para producirlos; uso de dichos anticuerpos; composición farmacéutica; método y equipo de prueba de diagnóstico.** BIOGEN IDEC INC., CAMBRIDGE CENTER (US).
- 15 CN101130765, **Hybridomas cell strain with preserving number at CGMCC 1546, anti-respiratory syncytial virus N protein monoclonal antibody and respiratory syncytial virus detecting agent box (colloidal gold method), which can detects the respiratory syncytial virus.** (BEIJING ASCLE BIOENGINEERING CO., LTD). 2008-02-27
- 20 US6790611, **Assay for directly detecting RS virus related biological cell in a body fluid sample.** BESST TEST APS. 2004-09-14.

WO2009088159, **Antibodies to respiratory syncytial virus.** APROGEN INC. (KR). 2009-07-16

Erdman D. D. & Larry J. Anderson. Monoclonal Antibody-Based Capture Enzyme Immunoassays for Specific Serum Immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM Antibodies to Respiratory Syncytial Virus. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 1990, p. 2744-2749 Vol. 28, No. 12.
- 25 Murray, Jillian; Colin Loney, Lindsay B. Murphy, Susan Graham & Robert P. Yeo. 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), 252±261.

Avendano, L. F., M. A. Palomino, et al. (2003). "Surveillance for respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory infection in Chile (1989 to 2000)." J Clin Microbiol 41(10): 4879-4882.
- 30 Bont, L., J. Versteegh, et al. (2002). "Natural reinfection with respiratory syncytial virus does not boost virus-specific T-cell immunity." Pediatr Res52(3): 363-367.

Bourgeois, C., C. Corvaisier, et al. (1991). "Use of synthetic peptides to locate neutralizing antigenic domains on the fusion protein of respiratory syncytial virus." J Gen Virol72 (Pt 5): 1051-1058.
- 35 Bryce, J., C. Boschi-Pinto, et al. (2005). "WHO estimates of the causes of death in children." Lancet365(9465): 1147-1152.

Cabalka, A. K. (2004). "Physiologic risk factors for respiratory viral infections and immunoprophylaxis for respiratory syncytial virus in young children with congenital heart disease." Pediatr Infect Dis J23(1 Suppl): S41-45.

Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." BioTechniques15(3): 532-534, 536-537.
- 40 Erdman, D. D. and L. J. Anderson (1990). "Monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassays for specific serum immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM antibodies to respiratory syncytial virus." J Clin Microbiol28(12): 2744-2749.

Li, D., D. A. Jans, et al. (2008). "Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein." J Virol82(17): 8863-8870.
- 45 Murray, J., C. Loney, et al. (2001). "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." Virology289(2): 252-261.

Reichert, J. M. "Antibody-based therapeutics to watch in 2011." MAbs3(1).

van den Hoogen, B. G., S. Herfst, et al. (2004). "Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses." Emerg Infect Dis10(4): 658-666.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS PARA EL ANTÍGENO M2-1 DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL (VRS)

10

<130> PXWO 148/2012

<150> CL 3002-2011

<151> 25-11-2011

15

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1

<211> 420

<212> ADN

<213> hIbriidoma 8A4/G9 – IgG VH

25

<400> 1

atgaagttgg ggttcagctg gattttcctt gtoccttgttt taaaagggtgt ccagtgtgaa	60
ataattctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaggcctg gaggggtccct gaaactctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtcac tatgccatgt cttgggctcg ccagactccg	180
gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt aatagtgggtg gtagttatac ctactatcca	240
gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaattc cctatacctg	300
caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag aaagggggct	360
atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctctt cagccaaaac aacagcccca	420

30

<210> 2

<211> 384

<212> ADN

<213> hibridoma 8A4/G9 – IgG_k VL

<400> 2

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60
gacattgtgc tgacacagtc tctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc	120
atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggaac	180
caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct	240
gggggtccctg ccagggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	300
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gcttacacgt	360
tccgagggggg gaccaagctg gaaa	384

35

ES 2 657 619 T3

<210> 3
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> hibridoma 8A4/G9 – IgG VH

5

<400> 3

```

Met Lys Leu Gly Phe Ser Trp Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1           5           10           15

Val Gln Cys Glu Ile Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg
 20           25           30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35           40           45

Ser His Tyr Ala Met Ser Trp Ala Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50           55           60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
 65           70           75           80

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

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115          120          125

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

10 <210> 4
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> hibridoma 8A4/G9 – IgG_k VL

15 <400> 4

ES 2 657 619 T3

Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	1	5	10	15
Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	20	25	30	
Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Tyr	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	35	40	45	
Val	Ser	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Asn	Gln	Gln	Lys	Pro	50	55	60	
Gly	Gln	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	65	70	75	80
Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	85	90	95	
Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	100	105	110	
Gln	His	Ile	Arg	Glu	Leu	Thr	Arg	Ser	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Trp	Lys	115	120	125	

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo, que se une a la proteína M2-1 del virus respiratorio sincial (VRS) humano, caracterizado por que comprende la región variable de la cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 (IgGV_H-8A4/G9) y la región variable de la cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 (IgkV_L-8A4/G9).
- 5 2. Conjunto de secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo, que se une a la proteína M2-1 del virus respiratorio sincial (VRS) humano según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende la SEQ ID NO: 1 que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y la SEQ ID NO: 2 que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo.
- 10 3. Método de diagnóstico de infección por VRS en una muestra biológica, caracterizado por que el método comprende poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo, contra el VRS, de acuerdo a la reivindicación 1 y detectar la unión del anticuerpo con el antígeno.
4. Método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en células infectadas *in vitro* con el VRS, secreciones nasales, lavados nasales, secreciones faríngeas y/o lavados o secreciones bronquiales.
- 15 5. Método de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado por que la técnica utilizada corresponde a ELISA, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, citometría de flujo, clasificación celular, inmunoprecipitación y/o transferencia de Western.
6. Método de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado por que el anticuerpo, o fragmento del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, está conjugado con un marcador que permite su detección.
- 20 7. Método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que el anticuerpo está unido a un marcador seleccionado del grupo que consiste en fluoróforos, biotina, radioisótopos, enzimas y metales.
8. Kit de diagnóstico para detectar el VRS, caracterizado por que comprende al anticuerpo monoclonal contra el VRS de acuerdo a la reivindicación 1.
- 25 9. Kit de diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 8, caracterizado por que el anticuerpo está fijado a un soporte sólido.
10. Kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado por que el soporte sólido es una membrana formada por uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en nitrocelulosa, celulosa, polietileno y nylon.
- 30 11. Kit de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado por que corresponde a un ensayo inmunocromatográfico.

FIGURA 1

A

IgG VH-8A4/G9:

ATGAAGTTGGGGTTCAGCTGGATTTTCCTTGTCTTGTGTTTAAAAGGT
GTCCAGTGTGAAATAATTCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAG
GCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTT
TCAGTCACTATGCCATGTCTTGGGCTCGCCAGACTCCGGAGAAGAG
GCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAAATAGTGGTGGTAGTTATACCTACTA
TCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCC
AAGAATTCCCTATACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACAC
GGCCATGTATTACTGTGCAAGAAAGGGGGCTATGGACTACTGGGGTC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTTCAGCCAAAACAACAGCCCCA

IgGκ VL-8A4/G9:

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTC
AGGTTCCACTGGTGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAG
CTGTATCTCTGGGGCAGAGGGGCCACCATCTCATAAGGGGCCAGCAA
AAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAA
ACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAG
AATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT
ATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTCCGAGGGGGGACC
AAGCTGGAAA

B

IgG VH-8A4/G9:

MKLGFSWIFLVVLKGVQCEIILVESGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFSH
YAMSWARQTPEKRLEWVATINSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNSL
YLQMSSLRSEDTAMYYCARKGAMDYWGQGTSVTVSSAKTTAP

IgGκ VL-8A4/G9:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVS
TSGYSYMHWNQQKPGQPPRLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLN
IHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPSWK*NGLMLHQLY

FIGURA 2

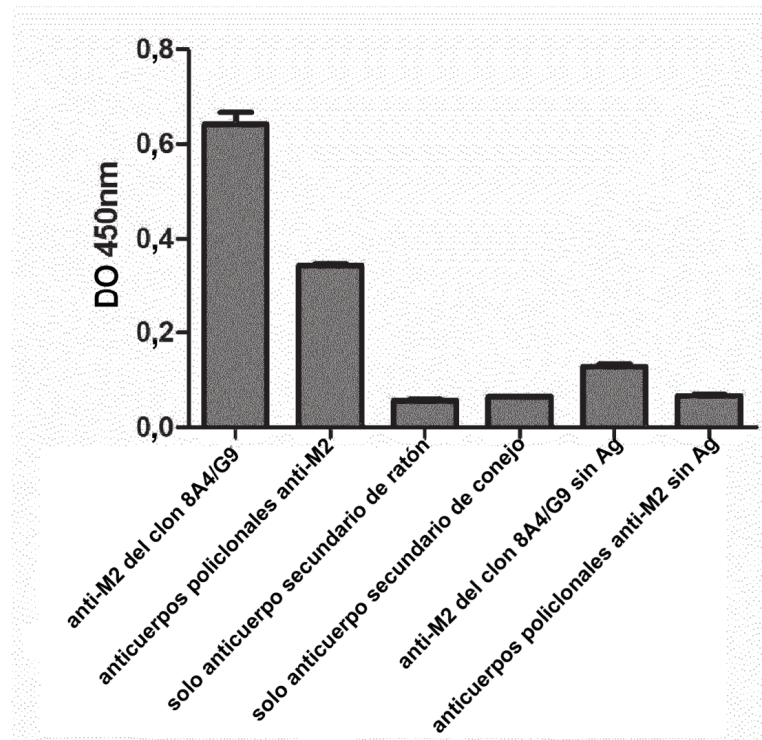


FIGURA 3

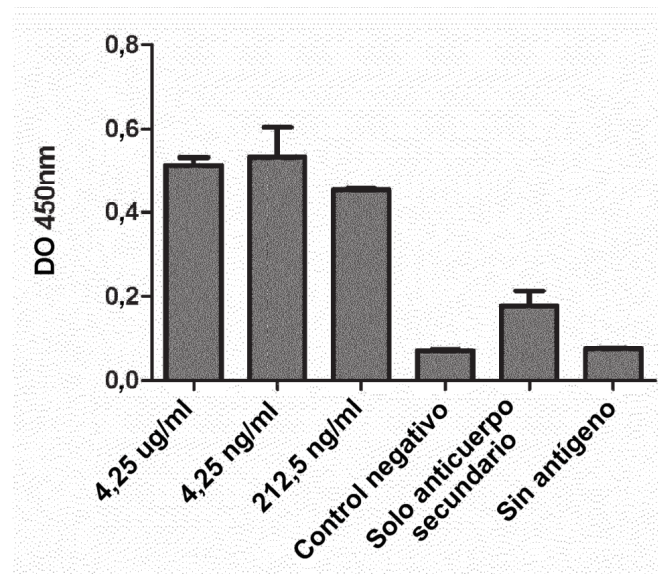


FIGURA 4

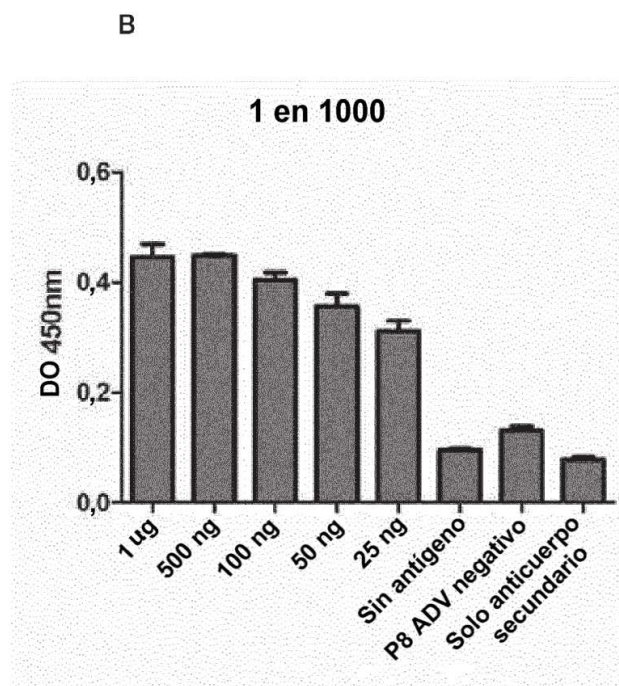
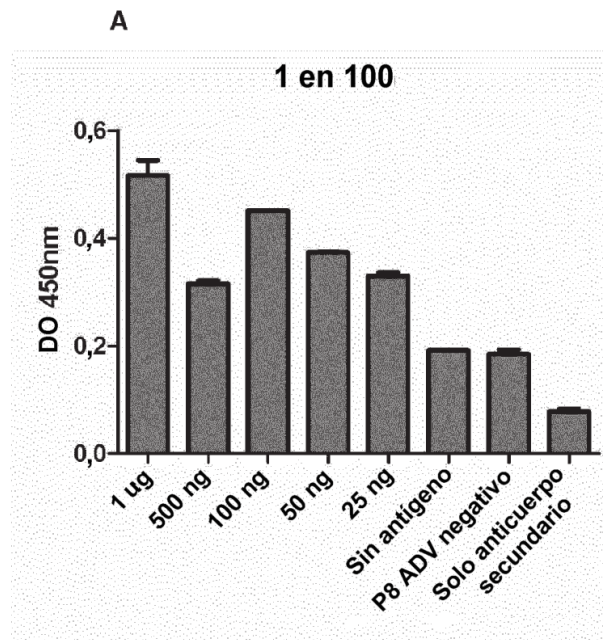


FIGURA 5

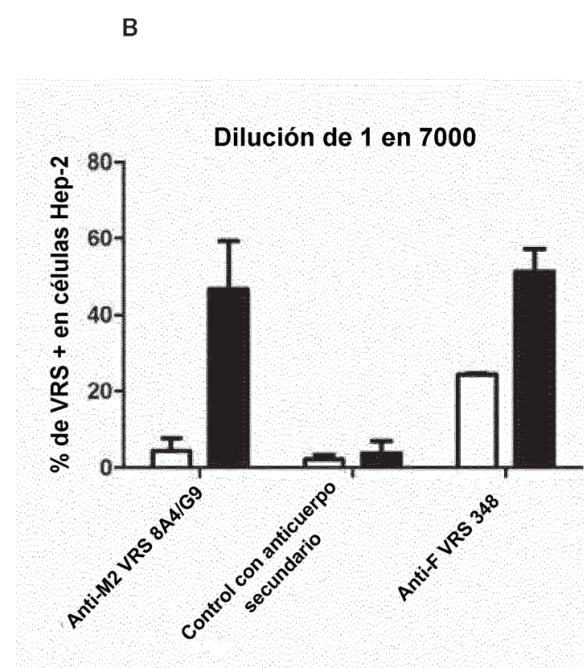
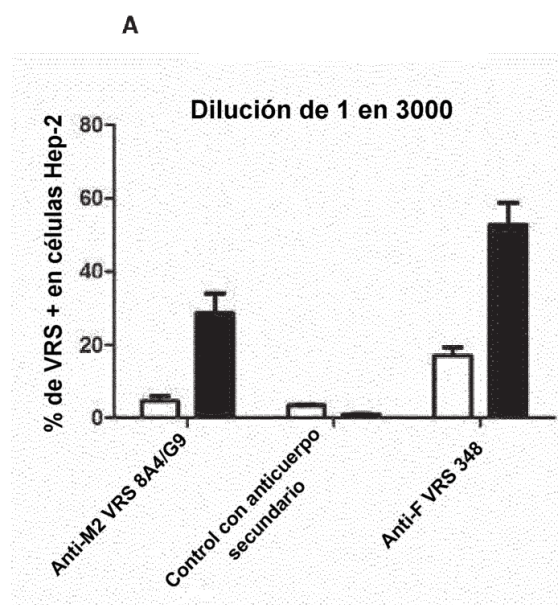
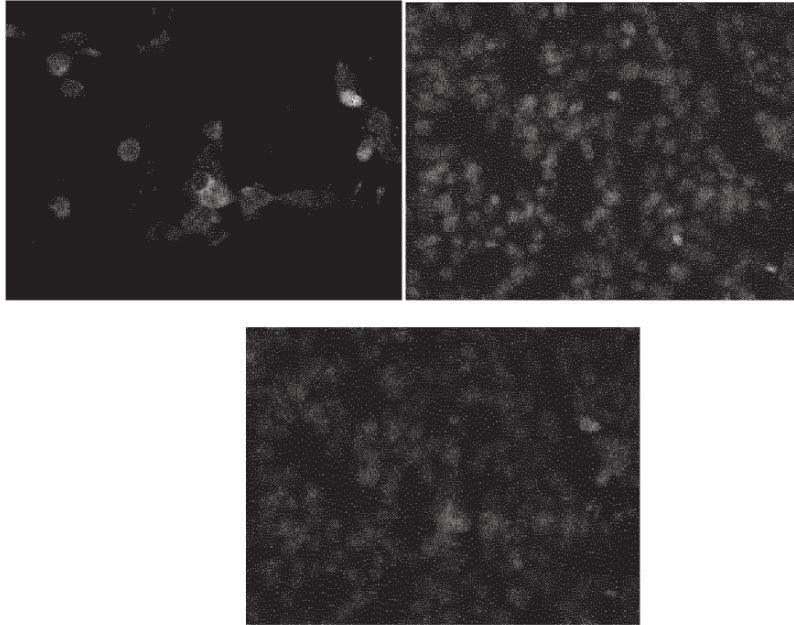


FIGURA 6

A



B

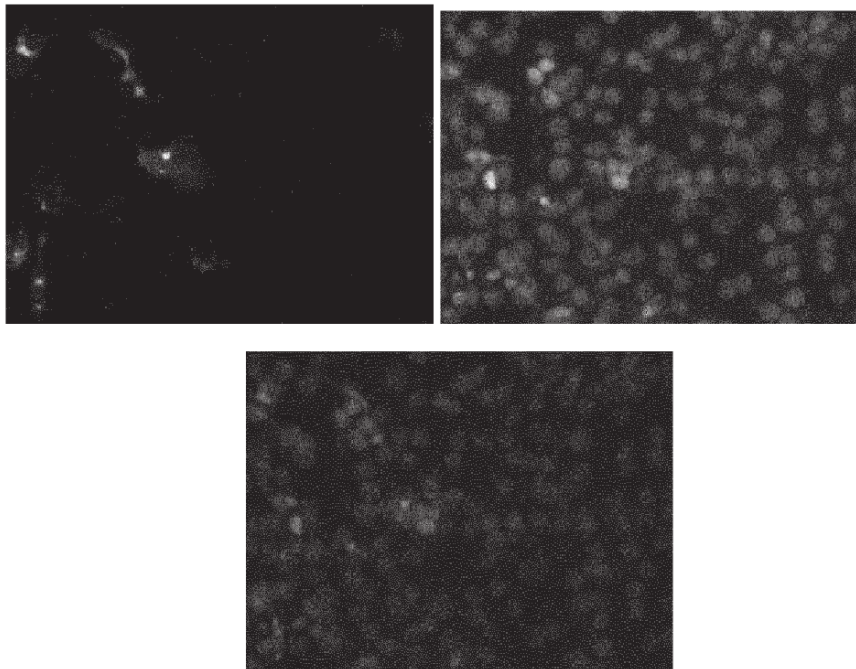
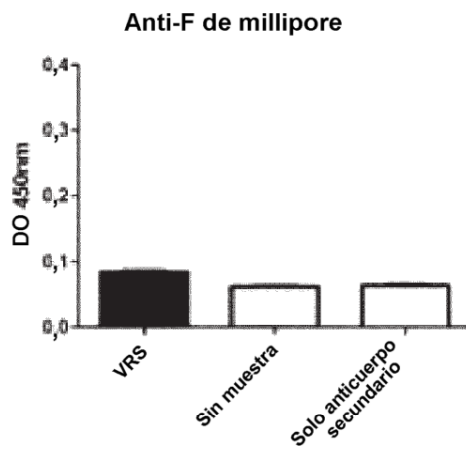
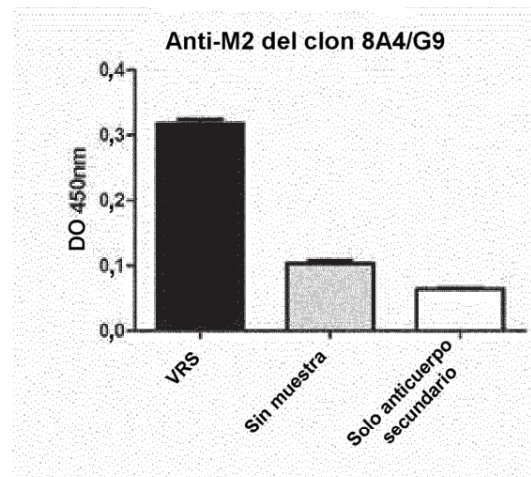


FIGURA 7

A



B



C

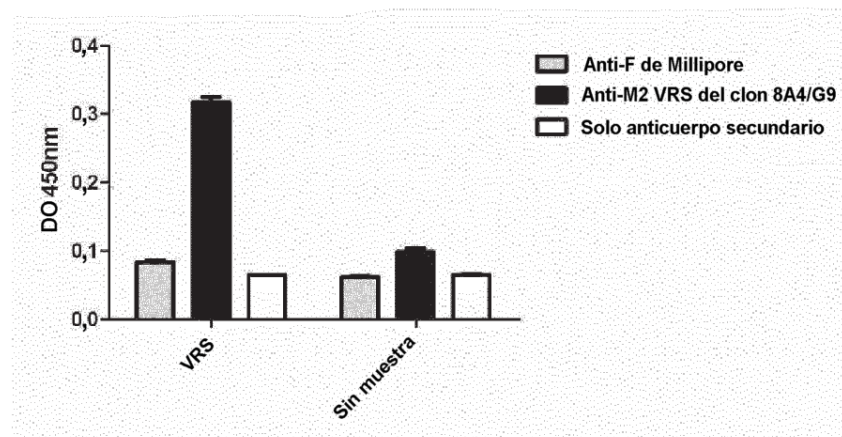


FIGURA 8

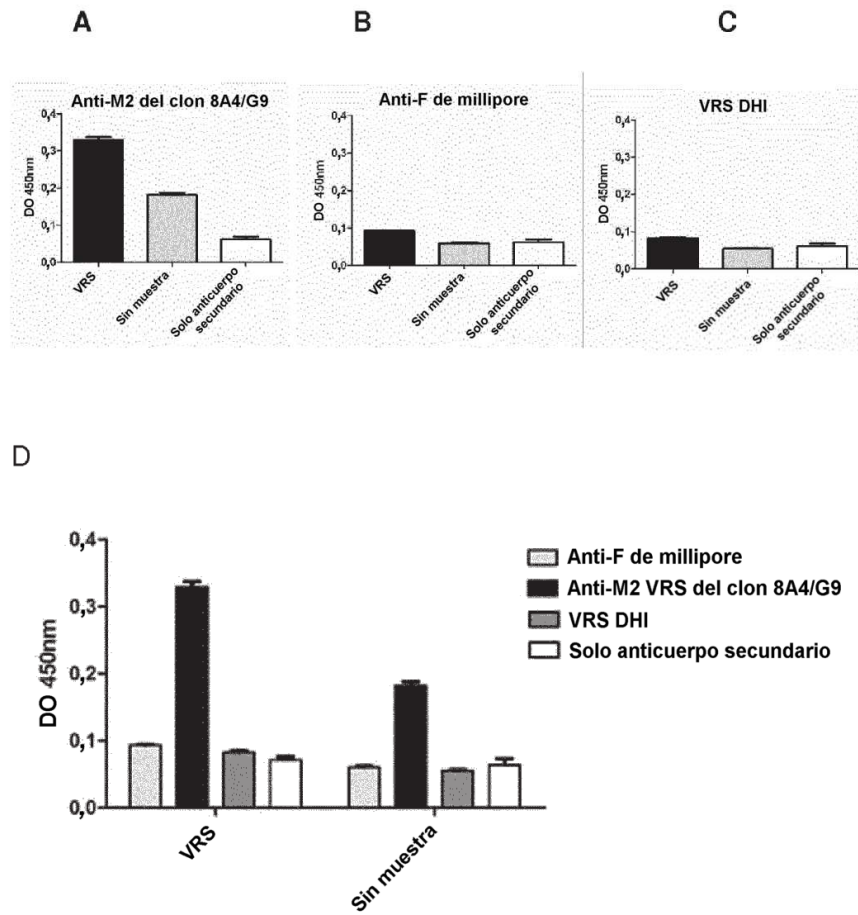


FIGURA 9

