

ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS PARA LA PROTEÍNA QUIMÉRICA L DEL VIRUS DE LA PARAINFLUENZA HUMANA (PIV), SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS; MÉTODO Y KIT DE DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN PRODUCIDA POR PIV

MEMORIA DESCRIPTIVA

Descripción de la invención

Se presentan anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, que reconocen la proteína quimera L del virus parainfluenza humano (PIV), donde dichos anticuerpos monoclonales o fragmentos de estos comprenden una región variable de cadena ligera donde su CDR1 (CDR_{LC1}) se define según la SEQ ID NO: 1, su CDR2 (CDR_{LC2}) se define por la SEQ ID NO: 2 y su CDR3 (CDR_{LC3}) corresponde a la SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena pesada donde su CDR1 (CDR_{HC1}) se define según la SEQ ID NO: 4, su CDR2 (CDR_{HC2}) corresponde a la SEQ ID NO: 5 y su CDR3 (CDR_{HC3}) corresponde a la SEQ ID NO: 6, o una región variable de cadena ligera donde su CDR1 (CDR_{LC1}) se define según la SEQ ID NO: 7, su CDR2 (CDR_{LC2}) se define por la SEQ ID NO: 8 y su CDR3 (CDR_{LC3}) corresponde a la SEQ ID NO: 9, y una región variable de la cadena pesada donde su CDR1 (CDR_{HC1}) se define según la SEQ ID NO: 10, su CDR2 (CDR_{HC2}) corresponde a la SEQ ID NO: 11 y su CDR3 (CDR_{HC3}) corresponde a la SEQ ID NO: 12. Donde dichos anticuerpos pueden ser utilizados como anticuerpo de detección y/o de captura. Se proporciona también un método de diagnóstico de infección por PIV en una muestra biológica que utiliza los anticuerpos monoclonales, y un kit de diagnóstico para detectar PIV, que comprenden al menos un anticuerpo monoclonal contra PIV de acuerdo a lo descrito previamente.

Antecedentes de la invención

El virus parainfluenza humano produce una enfermedad infectocontagiosa de las vías respiratorias superiores que se manifiesta en diversos cuadros clínicos que van desde un

resfriado común, hasta una neumonía. La laringotraqueobronquitis es la manifestación clínica más grave y frecuente.

Esta enfermedad es producida por un virus del tipo paramixovirus y se transmite con facilidad de persona a persona o a través de gotas o pequeñas partículas que han sido expulsadas a través de la tos o estornudos de una persona enferma, lo cual hace que su propagación sea rápida y forme parte de epidemias estacionales.

En Estados Unidos, el PIV es una de las principales causas de hospitalización por enfermedades respiratorias en niños pequeños, presentándose entre el 2 y 17% de los casos, lo que se traduce en 250.000 visitas a las salas de emergencia y 700.000 hospitalizaciones. Entre los menores de 5 años, 1,2 niños son hospitalizados por esta causa anualmente, siendo esta tasa mayor en los menores de 6 meses¹.

El PIV tiene un impacto más variable con respecto a los otros virus respiratorios, siendo el responsable del 3 al 10% de las hospitalizaciones con cuadros de bronquiolitis, neumonía y laringotraqueobronquitis. Al igual que el virus respiratorio sincicial (VRS), el PIV causa enfermedades graves los primeros seis meses de vida. La infección por PIV alcanza su pico entre los 4 y 12 años de edad².

La infección causada por PIV, puede ser diagnosticada mediante el uso de métodos de detección directos, es decir por detección de anticuerpos directamente en la muestra o mediante pruebas serológicas que permiten medir la presencia de anticuerpo IgM o el aumento de los títulos de IgG. También se emplean ensayos con líneas celulares para el aislamiento de PIV en el laboratorio clínico.

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5813689/>

² <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/264249/PMC2486968.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

En el caso del aislamiento del virus en cultivos celulares, éste corresponde a un método específico y sensible, sin embargo presenta la desventaja que demora de entre 10-15 días en conferir un resultado, siendo más bien una técnica de confirmación que de diagnóstico inicial por su lentitud. En el caso de las pruebas serológicas que permiten medir la presencia de anticuerpos IgM e IgG en el paciente, éstas son pruebas genéricas que no permiten determinar específicamente la infección por virus PIV, ni determinar el tipo de PIV. Existen 4 tipos de PIV, tipo 1, 2, 3 y 4, siendo los de tipo 1 y 2 los que suelen aparecer de forma epidémica.

Adicionalmente, también se utilizan técnicas moleculares como la reacción de polimerasa en cadena (PCR) para detectar ciertos segmentos de ARN contenidos en el virus, a partir de una retrotranscripción del ARN a ADN complementario, utilizando este último como molde para realizar el PCR. En el documento US6015664A presenta un método para determinar la presencia o ausencia de infecciones virales múltiples en una muestra biológica por medio de un ensayo de PCR múltiplex. El método incluye partidores nucleotídicos junto con sondas para la detección de secuencias de ácido nucleico complementarias del virus parainfluenza humano 1, 2 y 3, virus sincicial respiratorio A y B y virus de la gripe, A y B.

En el documento CN102140550A se divulga un kit de RT-PCR para detectar el virus parainfluenza en un paso, donde el kit incluye partidores específicos para el virus parainfluenza. A.

Por su parte, el documento CN105441589A describe un kit de detección del virus parainfluenza tipo 1, 2, 3 y 4, por medio un PCR cuádruple. El kit de detección de PCR cuádruple comprende cebadores y sondas genéticas específicas del virus parainfluenza humano.

Existen también diversos kits basados en inmunofluorescencia para la detección de diversos virus respiratorios, entre ellos parainfluenza. Por ejemplo, el kit D3 Ultra DFA (direct fluorescent antibody) permite la identificación cualitativa de
5 diversos virus respiratorios: influenza A, influenza B, virus respiratorio sincicial, adenovirus, parainfluenza 1, parainfluenza 2 y parainfluenza 3.

En base a los antecedentes previos, se hace fundamental generar y contar con un método de detección eficaz, rápido y de bajo
10 costo, para la detección del virus de parainfluenza que pueda competir con los métodos de diagnósticos utilizados actualmente. En este caso, el uso de anticuerpos monoclonales que detectan proteínas presentes en el virus, son considerados como una alternativa para mejorar la detección del virus de influenza.

15 **Descripción de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína quimera L o fragmentos de ésta, del virus de parainfluenza humano, en adelante PIV. De forma particular, la invención corresponde a anticuerpos monoclonales,
20 o fragmentos de los mismos, que reconocen la proteína quimera L del virus parainfluenza humano (PIV) secretados por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6, donde dichos anticuerpos monoclonales o fragmentos de estos comprenden una región variable de cadena ligera donde su CDR1 (CDR_{LC1}) se define según la SEQ ID NO: 1, su
25 CDR2 (CDR_{LC2}) se define por la SEQ ID NO: 2 y su CDR3 (CDR_{LC3}) corresponde a la SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena pesada donde su CDR1 (CDR_{HC1}) se define según la SEQ ID NO: 4, su CDR2 (CDR_{HC2}) corresponde a la SEQ ID NO: 5 y su CDR3 (CDR_{HC3}) corresponde a la SEQ ID NO: 6, o una región variable de cadena
30 ligera donde su CDR1 (CDR_{LC1}) se define según la SEQ ID NO: 7, su CDR2 (CDR_{LC2}) se define por la SEQ ID NO: 8 y su CDR3 (CDR_{LC3})

corresponde a la SEQ ID NO: 9, y una región variable de la cadena pesada donde su CDR1 (CDR_{HC1}) se define según la SEQ ID NO: 10, su CDR2 (CDR_{HC2}) corresponde a la SEQ ID NO:11 y su CDR3 (CDR_{HC3}) corresponde a la SEQ ID NO: 12. Dichos anticuerpos pueden ser utilizados como anticuerpo de detección y/o de captura. Se proporciona también un método de diagnóstico de infección por PIV en una muestra biológica que utiliza los anticuerpos monoclonales, y un kit de diagnóstico para detectar PIV, que comprenden al menos un anticuerpo monoclonal contra PIV de acuerdo a lo descrito previamente.

Debido a que el antígeno no era completamente conservado, sino que partes de la secuencia eran las que se conservaban, se generó una nueva secuencia a partir de la unión de las partes conservadas. Por lo que, los anticuerpos reconocen una proteína quimera, particularmente la proteína quimera L del virus de la parainfluenza humana.

Los anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína L o fragmentos de ésta presentan importantes características técnicas ventajosas y destacables con respecto a otros anticuerpos y métodos de detección de antígenos virales ya existentes. En primer lugar, cada virus tiene proteínas de superficie específicas, por tanto, otras técnicas de diagnóstico basadas en anticuerpos monoclonales para otros tipos de virus respiratorios no son comparables a la invención propuesta. La especificidad de detección de los anticuerpos contra la proteína L de PIV respecto de otros antígenos virales, por ejemplo contra la proteína PB2 del virus influenza, se demuestra en los resultados provistos en las figuras 1A y 1B de la presente solicitud. A partir de estos resultados es posible concluir que los anticuerpos provistos en el alcance de la presente solicitud sólo reconocen a la proteína L de PIV, y que en ensayos de ELISA con antígenos del virus FLU no se observó señal de detección.

En segundo lugar, los anticuerpos parte del alcance de la invención permiten detectar de forma específica a la proteína L o fragmentos de ésta, de tal forma que no compiten entre sí por el sitio de unión al antígeno, ni ejercen un impedimento para unirse simultáneamente a este. Adicionalmente, permiten detectar la proteína L o fragmentos de ésta con alta sensibilidad en muestras que contengan escasa cantidad de antígeno.

Los anticuerpos monoclonales propuestos son capaces de detectar a la proteína L, una proteína conservada. La estrategia de detección de una proteína viral conservada permite que los anticuerpos parte del alcance de la invención detecten diferentes tipos del virus parainfluenza humano, entre ellos, parainfluenza 1, 2, 3 y 4.

Cuando en la presente invención se hace referencia a secuencias CDR estas corresponden a secuencias cortas que se encuentran en los dominios variables de las proteínas que presentan función de detección de antígenos. Se presentan las secuencias CDR para la cadena pesada (CDR_{HC}) y la cadena liviana (CDR_{LC}) de los anticuerpos secretados por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6.

Los anticuerpos monoclonales descritos pueden ser utilizados para ensayos de detección, diagnóstico y/o determinación de infección por PIV. Estos anticuerpos pueden ser utilizados simultáneamente para incrementar la sensibilidad de detección en muestras clínicas donde existe escasa cantidad y disponibilidad de antígeno. Al respecto, se proporciona también un método de diagnóstico de infección de PIV en una muestra biológica, el que comprende poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo monoclonal contra la proteína L de PIV o un fragmento de él de acuerdo a la reivindicación, y detectar la unión del anticuerpo con el antígeno. La muestra biológica puede

corresponder, sin limitarse, a células *in vitro* infectadas con PIV, secreciones nasales, lavados nasales, líquido cefalorraquídeo, secreciones faríngeas y/o lavados o secreciones bronquiales. Como parte del método, el ensayo utilizado para la
5 detección de la unión antígeno-anticuerpo se selecciona de ELISA, luminex, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, citometría de flujo, cell sorter, inmunoprecipitación y/o Western blot.

La presente invención incluye también un kit de diagnóstico para
10 detectar al virus de la influenza humana, el que comprende: un anticuerpo monoclonal contra la proteína L de PIV o un fragmento de la misma, donde dicho anticuerpo puede actuar como anticuerpo de captura o de detección, donde particularmente, el anticuerpo de detección se encuentra conjugado a un marcador para su
15 detección; un soporte sólido al cual se adosa el anticuerpo; y reactivos para detectar el marcador incluido en el anticuerpo de detección, tales como fluoróforos, biotina, radioisótopos, metales y enzimas.

En la presente invención cuando se refiere a anticuerpo de
20 captura, éste corresponde al anticuerpo que se une específicamente al antígeno. En el caso del anticuerpo de detección este corresponde al anticuerpo al cual se le conjuga un marcador para ser detectado por diferentes test tales como test inmunocromatográfico, luminex, citometría de flujo,
25 inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis, Western blot, Dot plot, ELISA, luminex, inmunodifusión o inmunoprecipitación.

Los anticuerpos parte de la presente invención pueden actuar de forma dual como anticuerpo de captura o como anticuerpo de
30 detección cuando se acopla a marcador de detección. El marcador de detección estará conjugado al anticuerpo de detección, y éste puede corresponder, sin limitarse, a fluoróforos, biotina,

radioisótopos, metales y enzimas. De forma preferente, el anticuerpo de detección se conjuga al sistema reportero basado en la detección de la actividad de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés).

5 Descripción de las figuras de la invención

Figura 1: Detección de proteína quimera L de PIV por los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6, mediante un ensayo de ELISA indirecto. La placa fue
10 activada con 50 ng de proteína L de PIV recombinante purificada, 50 ng de proteína PB2 de Flu (como control de especificidad) y 20 µg de lisado bacteriano de *E. coli* cepa BL21 sin plásmido (utilizadas como control de especificidad) y 3 clones (C1, C2 y C3) de la misma cepa, en las cuales se sobre-expresó la proteína
15 L. Se incluyeron pocillos control sin antígeno, con anticuerpo primario, con anti-IgG de ratón conjugado con HRP (sin activar) y pocillos sin antígeno ni anticuerpo primario, solo con anticuerpo anti-IgG de ratón (HRP), datos no mostrados en el gráfico. Posteriormente, los pocillos se incubaron con los
20 anticuerpos anti-L provenientes del hibridoma 2F11B1, en cantidad de 170 ng (**A**) y el hibridoma 4D8C6 en cantidad de 170 ng (**B**). No se utilizó anticuerpo comercial contra la proteína L, ya que no se encuentra disponible ninguno en la actualidad, que puedan ser utilizados en la técnica de ELISA. Los datos mostrados
25 en el gráfico expresan la absorbancia detectada a 450 nm, emitida por la conversión del sustrato Tetrametilbenzidina a un compuesto coloreado, catalizada por la enzima Horseradish peroxidase (HRP) presente en un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón que se unió específicamente a los anticuerpos secretados
30 por los hibridomas 2F11B1 y 4D8C6. Los valores corresponden al promedio +/- la desviación estándar de la absorbancia emitida por cada muestra en al menos dos experimentos independientes. *

$P < 0,05$ y $** P < 0,01$ por el test de student paramétrico comparando los resultados de la proteína PB2-Flu versus los de L-PIV, y por otro se utilizó el test de ANOVA de una vía comparando lisado de *E. coli* BL21 sin plásmido versus lisado de *E. coli* BL21 que
5 sobreexpresaban la proteína L. Las letras ns, significa que no se observa diferencia significativa.

**Figura 2: Determinación de sensibilidad de anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6 en la
10 detección de la proteína L de PIV.**

Placas de ELISA se activaron con diluciones seriadas 1:2, iniciando con 50 ng de proteína L y finalizando con 0,04 ng. Posteriormente, los pocillos se incubaron con los anticuerpos anti-L provenientes del hibridoma 2E11B5, en cantidad de 170 ng (**A**) y el hibridoma 4D8C6 en
15 cantidad de 170 ng (**B**). Se incluyeron pocillos sin activar como control negativo. Los datos mostrados en el gráfico expresan la absorbancia a 450 nm emitida por la conversión del sustrato Tetrametilbenzidina a un compuesto coloreado catalizada por la enzima Horseradish peroxidase (HRP) presente en los anticuerpos
20 anti-L provenientes de los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6 en cantidad de 170 ng (**A** y **B**). Los valores corresponden al promedio $\pm$ la desviación estándar de la absorbancia emitida por cada muestra en al menos dos experimentos independientes. $** P < 0,01$ y $*** P < 0,001$ por el test de student paramétrico comparando los
25 resultados del pocillo denominado control (sin muestra) versus cada una de las diluciones de la proteína L.

**Figura 3: Ensayo de diluciones seriadas de los anticuerpos monoclonales anti-L de Flu producidos por los hibridomas 2E11B5
30 y 4D8C6, para la detección de antígenos purificados de PIV.**

Se activaron placas de ELISA con 50 ng de proteína recombinante L de PIV y se detectó el antígeno con 11 diluciones seriadas 1:2 de los anticuerpos anti-L 2E11B5 (**A**) ó 4D8C6 (**B**), partiendo desde

una concentración de 3,4 µg/mL (170 ng por pocillo). Los datos se expresan como el promedio +/- la desviación estándar del valor de la absorbancia emitida a 450 nm de cada muestra en duplicado, en al menos dos experimentos independientes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ por el test de student paramétrico comparando los resultados del pocillo denominado control (sin anticuerpo 2E11B5 o 4D8C6) versus cada una de las diluciones de los anticuerpos.

Figura 4: Detección de proteína L de PIV, en células infectadas, por los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6, mediante un ensayo de Luminex.

La placa fue activada con 50 ng de proteína L de PIV recombinante purificada, 20 µg de células MDCK no infectadas (utilizadas como control de especificidad) e infectadas con PIV. Se incluyó un pocillo control sin antígeno, con anticuerpo primario, con anti-IgG de ratón conjugado con HRP (NTC. Posteriormente, los pocillos se incubaron con los anticuerpos anti-L provenientes del hibridoma 2E11B5 (conjugados a la región 21 de PIV), en cantidad de 50 microesferas/µl, el cual fue utilizado como anticuerpo de captura y el hibridoma 4D8C6 a una concentración de 4 µg/mL utilizado como anticuerpo de detección conjugado con biotina. Posteriormente, el complejo de anticuerpos y muestra fue incubado con Streptavidina/Ficoeritrina a una concentración de 6 µg/mL. Los datos mostrados en el gráfico expresan la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés). Se realizó el test de student no paramétrico comparando las células no infectadas versus las infectadas con PIV, y la proteína L recombinante versus el control negativo (** $P < 0,01$ y **** $P < 0,0001$).

Figura 5: Detección de PIV en muestras clínicas mediante ELISA en Sándwich y Luminex tipo Sándwich, utilizando la combinación

de los anticuerpos monoclonales secretados por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6 para PIV. A)

Placas de ELISA fueron activadas con 170 ng de anticuerpo secretado por el hibridoma 2E11B5 (anti-PIV), funcionando como anticuerpo de captura. Los pocillos
5 activados con los anticuerpos de captura para cada virus se incubaron con 50 μ l de muestras de hisopado nasofaríngeo (HNF) de pacientes que presentaban cuadros respiratorios virales. Como controles negativos se analizaron 10 muestras de controles sanos. Se utilizaron 16 muestras de pacientes positivos para PIV
10 y como control de especificidad, se incluyeron 3 muestras de pacientes positivos para el virus Influenza (Flu+). Como control positivo se incluyeron pocillos a los que se añadió proteína L-PIV purificada. Para la detección de la proteína capturada por el anticuerpo 2E11B5, se utilizaron los anticuerpos producidos
15 por el hibridoma 4D8C6, conjugados a la enzima Horseradish Peroxidase, en una dilución 1:2000 (1,8 ng/ μ l por pocillo). **B)**

Placas de Luminex fueron activadas con 50 microesferas magnéticas por μ l, las cuales estaban conjugadas con el anticuerpo secretado por el hibridoma 2E11B5 (anti-PIV),
20 funcionando como anticuerpo de captura. Las microesferas conjugadas se incubaron con 50 μ l de muestras de hisopado nasofaríngeo (HNF) de pacientes que presentaban cuadros respiratorios virales. Como controles negativos se analizaron 8 muestras de controles sanos. Se utilizaron 14 muestras de
25 pacientes positivos para PIV y como control positivo se incluyeron pocillos a los que se añadió proteína L-PIV purificada. Para la detección de la proteína capturada por el anticuerpo 2E11B5, se utilizaron los anticuerpos producidos por el hibridoma 4D8C6, conjugados al fluoróforo biotina, a una
30 concentración de 4 μ g/mL. El complejo (microesferas conjugadas con anticuerpo de captura, antígeno y anticuerpo de detección) es incubado con Streptavidina/Ficoeritrina a una concentración

de 6 µg/mL. Los datos muestran la mediana del valor de la absorbancia emitida a 450 nm **(A)** o de MFI **(B)** de cada muestra (** $P < 0,01$ y **** $P < 0,0001$; mediante el test de student no paramétrico comparando pacientes positivos de PIV versus
5 controles sanos, y frente a los virus usados como control de especificidad).

Figura 6: Detección de proteína L mediante ensayo de ELISA indirecto, utilizando los anticuerpos monoclonales secretados por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6 conjugados con biotina.

En la figura se presenta un gráfico donde se expresan la absorbancia a 450 nm emitida por la conversión del sustrato Tetrametilbenzidina a un compuesto coloreado catalizada por la enzima Horseradish peroxidase (HRP). Las muestras en negro y
15 blanco corresponden al ensayo realizado con fragmentos del anticuerpo secretados por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6 respectivamente, mientras que en gris se presentan los ensayos realizados con los anticuerpos monoclonales completos secretados por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6. Se muestra el promedio del
20 valor de la absorbancia emitida a 450 nm de cada muestra (donde b es igual a $p < 0,0001$ comparado con a y d es igual a $p < 0,0001$ comparando con c; mediante la prueba de ANOVA de 2 vías comparando el pocillo sin muestra versus el pocillo con proteína con todos los anticuerpos).

Ejemplos que permiten demostrar las distintas aplicaciones de los anticuerpos monoclonales de la invención.

30 **Ejemplo 1: Determinación de la secuencia nucleotídica que codifica las cadenas livianas (VL) y pesadas (VH) de la región variable del anticuerpo anti L PIV secretado por el hibridoma 2E11B5.**

El hibridoma 2E11B5 se creció en medio de cultivo DMEM-high glucose suplementado con 3,7 g/L de Bicarbonato de Sodio y 10% de suero fetal bovino, a 37° C con 10% CO₂, hasta una densidad celular de 700.000 células/mL. Se obtuvo el RNA total de 3,5 x10⁶ células, realizando un tratamiento con el compuesto Trizol (Invitrogen). Se utilizó 0,5 µg de RNA para generar el cDNA mediante reacción de retrotranscripción con el kit PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis, el cual utiliza partidores universales específicos del isotipo. La cadena liviana y pesada del anticuerpo se amplificaron de acuerdo con el procedimiento operativo estándar (SOP) de amplificación rápida de los extremos de cDNA (RACE) de GenScript. Los fragmentos de anticuerpo amplificados se clonaron por separado en un vector de clonación estándar. Se realizó una PCR de colonias para identificar clones que tuvieran insertos con el tamaño correcto. Al menos cinco colonias con insertos de tamaños correctos se secuenciaron por cada fragmento. Se alinearon las secuencias de diferentes clones y se proporcionó la secuencia de consenso de estos clones. Las secuencias nucleotídicas de las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos secretados por el hibridoma 2E11B5 corresponden a las identificadas como SEQ ID NO. 1; SEQ ID NO.2 respectivamente.

Ejemplo 2: Determinación de la secuencia nucleotídica que codifica las cadenas livianas (VL) y pesadas (VH) de la región variable del anticuerpo anti L PIV secretado por el hibridoma 4D8C6.

El hibridoma 4D8C6 se creció en medio de cultivo DMEM-high glucose suplementado con 3,7 g/L de Bicarbonato de Sodio y 10% de suero fetal bovino, a 37° C con 10% CO₂, hasta una densidad celular de 700.000 células/mL. Se obtuvo el RNA total de 3,5

x10⁶ células, realizando un tratamiento con el compuesto Trizol (Invitrogen). Se utilizó 0,5 µg de RNA para generar el cDNA mediante reacción de retrotranscripción con el kit PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis, el cual utiliza partidores universales específicos del isotipo. La cadena liviana y pesada del anticuerpo se amplificaron de acuerdo con el procedimiento operativo estándar (SOP) de amplificación rápida de los extremos de cDNA (RACE) de GenScript. Los fragmentos de anticuerpo amplificados se clonaron por separado en un vector de clonación estándar. Se realizó una PCR de colonias para identificar clones que tuvieran insertos con el tamaño correcto. Al menos cinco colonias con insertos de tamaños correctos se secuenciaron por cada fragmento. Se alinearon las secuencias de diferentes clones y se proporcionó la secuencia de consenso de estos clones. Las secuencias nucleotídicas de las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos secretados por el hibridoma 4D8C6 corresponden a las identificadas como SEQ ID NO. 3; SEQ ID NO.4 respectivamente.

Ejemplo 3: Ensayo de detección de antígenos de PIV, determinación de especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-L de PIV para antígenos purificados de PIV mediante ensayo de ELISA indirecto.

Este ensayo tiene como objetivo demostrar la especificidad por la proteína L de PIV de los anticuerpos producidos por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6. La detección del antígeno se llevó a cabo mediante la técnica de ELISA indirecto, donde la placa de ELISA se activó con 50 ng de antígeno purificado por 1 hora a 37°C. De igual manera se activó la placa con 20 µg de lisado bacteriano de *E. coli* cepa BL21 sin plásmido (utilizadas como control de especificidad) y 3 clones (C1, C2 y C3) de la misma cepa, en las cuales se sobre-expresó la proteína L. Otro control

negativo incluido fue 50 ng de proteína PB2 de Flu en un pocillo independiente. Posteriormente, la placa se lavó dos veces con buffer fosfato salino (PBS) 1X/Tween20 0,05%. Luego la placa se bloqueó por 2 horas a 37°C con PBS 1X/ Suero Fetal Bovino (FBS) 10%. Posteriormente se repitieron los lavados y a continuación se incubaron cada uno de los anticuerpos (2E11B5 y 4D8C6) a una concentración final de 3,4 µg/mL (170 ng por pocillo), diluidos en PBS 1X/FBS 10%, por 1 hora a 37°C (cada anticuerpo en una placa independiente). Transcurrido el tiempo de incubación, se repitieron los lavados y se agregó a cada uno de los pocillos un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con la enzima peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase, HRP) en dilución 1 en 2000 (0,5 ng/µl por pocillo) en PBS 1X/FBS 10%, por 1 hora a temperatura ambiente (≈ 25°C), en oscuridad. Finalmente, se realizaron los lavados y se reveló con 50 µL de buffer citrato/Tetrametilbenzidina (TMB, 3-3'-5-5'-tetramethylbenzidine, 1mg/mL, Becton Dickinson). Para detener la reacción se adicionaron 50 µL de H₂SO₄ 2N y el resultado se leyó en un lector de ELISA, a 450nm. Para determinar que la reacción del anticuerpo secundario era específica en reconocer al anticuerpo primario y además que la señal obtenida no sea provocada por unión inespecífica del anticuerpo secundario al antígeno viral, se realizaron controles en los cuales se utilizó solamente el anticuerpo secundario sin anticuerpo primario ni muestra (pocillo sin activar). Otro control para determinar que la reacción del anticuerpo primario es específica para el antígeno, consistió en el uso de los anticuerpos sobre una placa de ELISA que no ha sido activada con el antígeno (sin antígeno) o usando los anticuerpos sobre una placa de ELISA que poseía 50 ng de la proteína PB2 de Flu ó lisado de *E. coli* cepa BL21 sin plásmido. Los resultados muestran que los anticuerpos monoclonales de la invención son capaces de reconocer 50 ng de antígeno purificado, de manera específica, ya que no reconocen

la proteína PB2 de Flu, ni proteínas de lisado bacteriano con alta señal (**Figura 1A y 1B**), como se observa en el caso de los 3 clones que sobreexpresan la proteína L. No se utilizó un anticuerpo comercial para comparar, porque en el comercio no existen anticuerpos anti-L de Parainfluenza, la gran mayoría comercializados han sido realizados y contra la fosfoproteína (P), la nucleoproteína (NP) ó la Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN). Se encontró un estudio, donde Machiko Nishio y colaboradores (2000 y 2011), en el cual se generaron anticuerpos anti-L de Parainfluenza. Estos anticuerpos sólo son dirigidos contra un serotipo de PIV, serotipo 2 y no para los 3 serotipos más prevalente en enfermedades respiratorias (PIV 1, 2 y 3), como es el caso de estos anticuerpos. Por otro lado, los anticuerpos anti-L publicados no han sido comercializados hasta el momento. Todos los controles negativos utilizaron entregaron resultados esperados (datos no mostrados en la figuras).

Ejemplo 4: Ensayo para determinar la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos virales anti-L de PIV.

El ensayo se realizó para determinar la máxima dilución de proteína que los anticuerpos monoclonales anti-L de PIV provenientes de los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6 son capaces de detectar mediante ELISA indirecto. Para esto, se ocupó la misma técnica descrita en el ejemplo 3. Se activó la placa con 11 diluciones seriadas 1:2 de proteína L de PIV, partiendo con 50 ng de antígeno purificado. Los anticuerpos anti-L 2E11B5 y 4D8C6, se utilizaron en una concentración final de 3,4 µg/mL (170 ng/pocillo), y fueron diluidos en PBS 1X/FBS 10%. Posteriormente se adicionó el anticuerpo de detección anti-IgG de ratón en una dilución de 1:2.000 (0,5 ng/µL por pocillo) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$), en oscuridad. Finalmente, se

realizaron los lavados y se reveló con 50 μ L de buffer citrato/Tetrametilbenzidina (TMB, 3-3'-5-5'-tetramethylbenzidine, 1mg/mL, Becton Dickinson). Para detener la reacción se adicionaron 50 μ L de H₂SO₄ 2N y el resultado se leyó en un lector de ELISA, a 450nm. Los resultados mostraron que el anticuerpo anti-L 2E11B5 es capaz de detectar hasta 390 picogramos (pg) de la proteína recombinante quimera L de PIV (**Figura 2A**). El anticuerpo anti-L proveniente del hibridoma 4D8C6, mostró mayor sensibilidad, que el anticuerpo anti-L 2E11B5 (**Figura 2B**), ya que fue capaz de detectar hasta 190 picogramos de proteína pura. Se incluyeron en todos los ensayos controles que permitieran descartar reacciones inespecíficas tanto de los anticuerpos, los cuales contenían todos componentes del ensayo exceptuando la muestra (proteína L PIV, datos no mostrados en los gráficos).

Ejemplo 5: Ensayo para determinar la eficiencia de los anticuerpos monoclonales para detectar antígenos virales de PIV, mediante ELISA indirecto.

El ensayo se realizó para determinar la máxima dilución de los anticuerpos monoclonales anti-L de PIV provenientes de los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6, que permiten la detección del antígeno viral. Se activó una placa ELISA con 50 ng de antígeno purificado (proteína L) y luego la placa fue bloqueada por 2 horas a 37°C con PBS 1X/ Suero Fetal Bovino (FBS) 10%. Los anticuerpos anti-L 2E11B5 y 4D8C6 se utilizaron en diluciones 1:2, partiendo de la concentración de trabajo (170 ng) hasta la dilución 11 (0,15 ng) en PBS 1X/FBS 10%. Posteriormente se adicionó el anticuerpo de detección anti-IgG de ratón en una dilución de 1:2.000 (0,5 ng/ μ L por pocillo) se incubo 1 hora a temperatura ambiente ($\approx$ 25°C), en oscuridad. Finalmente, se realizaron los lavados y se reveló con 50 μ L de buffer citrato/Tetrametilbenzidina (TMB, 3-

3'-5-5'tetramethylbenzidine, 1mg/mL, Becton Dickinson). Para detener la reacción se adicionaron 50 µl de H₂SO₄ 2N y el resultado se leyó en un lector de ELISA, a 450nm. En la **figura 3 (A y B)** se observa que ambos anticuerpos anti-L (2E11B5 y 4D8C6) pueden detectar 50 ng del antígeno purificado con alta eficiencia, ya que en todas las diluciones realizadas se observó detección del antígeno con alta señal. El control negativo incluido en este ensayo, corresponde a un pocillo que no contiene muestra (proteína L), fue bloqueado con PBS 1X/FBS 10%, se le adicionó anticuerpo primario (anti-L 2E11B5 ó anti-L 4D8C6) y contiene además anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP.

Ejemplo 6: Detección de proteína L de PIV en células infectadas con PIV, utilizando anticuerpos monoclonales anti-L de PIV, mediante la técnica de Luminex tipo Sándwich.

Al igual que en muestras de pacientes, la disponibilidad y la concentración de las proteínas viral generalmente es muy escasa en células infectadas, por lo que se quiso evaluar la detección del antígeno de interés en células infectadas con PIV (**figura 4**). Para este ensayo se realizó un ensayo de luminex tipo Sandiwch, usando como anticuerpo de captura el anticuerpo anti-L 2E11B5 y el anti-L 4D8C6 como anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección anti-L 4D8C6 de PIV, se conjugó con el fluoróforo biotina. Placas de Luminex fueron activadas con 50 microesferas magnéticas por (marcadas internamente con fluoróforo rojo o cercano al infrarrojo de diferentes intensidades) por µL, las cuales estaban conjugadas con el anticuerpo secretado por el hibridoma 2E11B5 (anti-PIV), funcionando como anticuerpo de captura (a una concentración final de 2,5 µM). Las microesferas conjugadas se incubaron con 50 µL de célula MDCK no infectadas e infectadas con PIV, durante

2 horas a temperatura ambiente ($\approx 23\text{ }^{\circ}\text{C}$), en agitación a 400 rpm y en oscuridad (tapados con papel de aluminio). Como control negativo no se incubó muestra en un pocillo y como control positivo se utilizó 50 ng de proteína L. Pasada las 2 horas, se

5 realizan 2 lavados con 100 μL PBS 1X-Tween20 al 0,05% durante 30 segundos utilizando el lavador magnético manual. Para la detección de la proteína capturada por el anticuerpo 2E11B5, se utilizaron los anticuerpos producidos por el hibridoma 4D8C6, conjugados al fluoróforo biotina, a una concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$

10 diluidos en PBS 1X-BSA 1%, incubándose los pocillos con 50 μL . La incubación se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad, agitando a 400 rpm. Se realizan nuevamente 2 lavados con 100 μL PBS 1X-Tween20 al 0,05% durante 30 segundos utilizando el lavador magnético manual. El complejo formado por

15 microesferas conjugadas con anticuerpo de captura más antígeno y anticuerpo de detección, es incubado con 50 μL de Streptavidina/Fi-coeritrina a una concentración final de 6 $\mu\text{g/mL}$. La incubación se realiza durante 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad, agitando a 400 rpm. Finalmente, se

20 realizan dos pasos de lavados más y se incuban los pocillos con 100 μL del reactivo Sheat fluid (reactivo utilizado por equipo Luminex para que el equipo lea las muestras), agitar 5 minutos a 400 rpm, en oscuridad. Los resultados de la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) son entonces

25 leídos en el equipo Luminex 200, el cual a través de un láser color rojo (621 nm), detecta la región de reconocimiento de la microesfera y el láser de color verde (511 nm) detecta la unión del anticuerpo de detección al analito.

30 Los resultados obtenidos para este ensayo se muestran en la **figura 4**, donde se puede observar que por la técnica de Luminex, utilizando el anticuerpo (anti-L) proveniente del hibridoma

2E11B5, como anticuerpo de captura y el anticuerpo proveniente del hibridoma 4D8C6-HRP como anticuerpo de detección, permite detectar el antígeno en células infectadas con PIV (**Figura 4**), sin detectar inespecíficamente antígenos de las células no infectadas, es decir los anticuerpos son capaces de discriminar entre muestras infectadas y no infectadas. Todas las muestras de células infectadas detectadas como positivas por Luminex son aquellas que muestran un MFI por encima de dos desviaciones estándar del promedio de MFI de las células no infectadas. Las células infectadas y no infectadas se procesaron igual que las muestras clínica mostradas en el ejemplo 7.

Ejemplo 7: Diagnóstico clínico de muestras de pacientes infectados con PIV, utilizando anticuerpos monoclonales anti-L de PIV, mediante la técnica de ELISA en Sándwich.

La disponibilidad y la concentración de las proteínas viral generalmente es muy escasa en muestras clínicas de hisopados nasofaríngeos, por lo que fue necesario modificar el ensayo de ELISA indirecto que se realizó previamente. Para este ensayo se realizó un ELISA en Sándwich, usando como anticuerpo de captura el anticuerpo anti-L 2E11B5 y el anti-L 4D8C6 como anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección anti-L 4D8C6 de PIV, se conjugó con HRP. Para el ensayo se activaron pocillos de una placa de ELISA con 3,4 µg/mL (170 ng/pocillo) del anticuerpo anti-L proveniente del hibridoma 2E11B5 de PIV, diluido en PBS 1X, durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X-Tween20 al 0,05% y posteriormente se bloqueó la placa con 200 µL de PBS 1X/FBS al 10% durante 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente y se incubó durante 1 hora a 37°C cada pocillo con 50 µL de hisopados nasofaríngeos de pacientes positivos para PIV de

acuerdo al método de diagnóstico "D³ Ultra DFA Respiratory Virus Screening and ID Kit de DHI (Diagnostics Hibryds) USA", denominado de manera rutinaria como "panel viral", y que fueron tratadas como se describe posteriormente. Como controles se incluyeron: 1) control de especificidad: se utilizaron 50 µL de muestra de pacientes diagnosticados con Flu mediante el panel viral para los anticuerpos anti-PIV; 2) control positivo: 50 ng de proteína L-PIV recombinante; 3) Control negativo: correspondiente a muestras de controles sanos. Posteriormente, se realizaron los 2 lavados correspondientes con PBS 1X-Tween20 0,05% y cada pocillo se incubó por 1 hora a temperatura ambiente (≈ 25°C, en oscuridad) con 50 µl del anticuerpo anti-L proveniente del hibridoma 4D8C6, conjugado con HRP (1,8 ng/µL de concentración final). A continuación, se lavó la placa 2 veces más, se reveló con 50 µL de solución TMB y se incubó durante 15 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µL de H₂SO₄ 2N y la lectura de la placa se realizó a 450 nm en un lector de ELISA (modelo Epoch), certificado para diagnóstico clínico.

Los resultados obtenidos para este ensayo se muestran en la **figura 5A**, donde se puede observar que la técnica de ELISA en Sándwich utilizando el anticuerpo (anti-L) proveniente del hibridoma 2E11B5, como anticuerpo de captura y el anticuerpo proveniente del hibridoma 4D8C6-HRP como anticuerpo de detección, permite detectar el antígeno en muestras de pacientes infectados con PIV (**Figura 5A**), los cuales fueron previamente confirmados por Inmunofluorescencia directa en un laboratorio clínico certificado utilizando el panel viral. La **figura 5A**, muestra los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-L de PIV, donde se utilizaron 43 muestras de pacientes diagnosticados como PIV positivo y como control de especificidad, se incluyeron 3 muestras de pacientes positivos para el virus Influenza. Como

control positivo se incluyeron pocillos a los que se añadió proteína L-PIV purificada. Como control negativo se utilizaron 10 controles sanos. Los resultados muestran que los anticuerpos anti-PIV son específicos en detectar sólo los pacientes positivos para PIV y no los controles sanos o aquellos infectados con otro virus (Flu). Todas las muestras detectadas positivas por ELISA son aquellas que muestran una densidad óptica (OD) por encima de 0,1.

10 **Tratamiento de muestras clínicas.** Las muestras que se utilizaron para los ensayos fueron obtenidas a partir de hisopados nasofaríngeos contenidos en medio de transporte universal (UTM). Se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se separó el sobrenadante (SN1) del pellet; este último fue incubado con 100 µL de Buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Deoxicolato de Sodio, 0,1%, SDS y un coctel de inhibidores de proteasas 1X) durante 15 minutos a 4°C, agitando por vortex cada 5 minutos. A continuación se centrifugó a 14.000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar se tomó el sobrenadante obtenido (SN2) y se mezcló con el SN1, se realizó vortex.

25 **Ejemplo 8: Diagnóstico clínico de muestras de pacientes infectados con PIV, utilizando anticuerpos monoclonales anti-L de PIV, mediante la técnica de Luminex tipo en Sándwich.**

Al igual que en la técnica de ELISA, la disponibilidad y la concentración de las proteínas viral generalmente es muy escasa en muestras clínicas de hisopados nasofaríngeos, por lo que se quiso evaluar por otra técnica más sensible lo obtenido en los resultados por la técnica de ELISA (**figura 5A**). Para este ensayo

se realizó un ensayo de luminex tipo Sandiwch, usando como anticuerpo de captura el anticuerpo anti-L 2E11B5 como anticuerpo de captura y el anti-L 4D8C6 como anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección anti-L 4D8C6 de PIV, se
5 conjugó con el fluoróforo biotina. Placas de Luminex fueron activadas con 50 microesferas magnéticas (marcadas internamente con fluoróforo rojo o cercano al infrarrojo de diferentes intensidades) por μL , las cuales estaban conjugadas con el anticuerpo secretado por el hibridoma 2E11B5 (anti-PIV),
10 funcionando como anticuerpo de captura (a una concentración final de 2,5 μM). Las microesferas conjugadas se incubaron con 50 μL de muestras de hisopado nasofaríngeo (HNF) de pacientes que presentaban cuadros respiratorios virales, durante 2 horas a temperatura ambiente ($\approx 23\text{ }^{\circ}\text{C}$), en agitación a 400 rpm y en
15 oscuridad (tapados con papel de aluminio). Como controles negativos se analizaron 8 muestras de controles sanos. Se utilizaron 14 muestras de pacientes positivos para PIV (de acuerdo al método de diagnóstico "D³ Ultra DFA Respiratory Virus Screening and ID Kit de DHI (Diagnostics Hibryds) USA",
20 denominado de manera rutinaria como "panel viral", las cuales se trataron de la misma manera mencionada anteriormente, y como control positivo se incluyeron pocillos a los que se añadió proteína L-PIV purificada (50 ng). Pasada las 2 horas, se realizan 2 lavados con 100 μL PBS 1X-Tween20 al 0,05% durante 30
25 segundos utilizando el lavador magnético manual. Para la detección de la proteína capturada por el anticuerpo 2E11B5, se utilizaron los anticuerpos producidos por el hibridoma 4D8C6, conjugados al fluoróforo biotina, a una concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$ diluidos en PBS 1X-BSA 1%, incubándose los pocillos con 50 μL .
30 La incubación se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad, agitando a 400 rpm. Se realizan nuevamente 2 lavados con 100 μL PBS 1X-Tween20 al 0,05% durante 30 segundos

utilizando el lavador magnético manual. El complejo formado por microesferas conjugadas con anticuerpo de captura más antígeno y anticuerpo de detección, es incubado con 50 μ L de Streptavidina/Fi-coeritrina a una concentración final de 6 μ g/mL. La incubación se realiza durante 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad, agitando a 400 rpm. Finalmente, se realizan dos pasos de lavados más y se incuban los pocillos con 100 μ L del reactivo Sheat fluid (reactivo utilizado por equipo Luminex para que el equipo lea las muestras), agitar 5 minutos a 400 rpm, en oscuridad. Los resultados de la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) son entonces leídos en el equipo Luminex 200, el cual a través de un láser color rojo (621 nm), detecta la región de reconocimiento de la microesfera y el láser de color verde (511 nm) detecta la unión del anticuerpo de detección al analito.

Los resultados obtenidos para este ensayo se muestran en la **figura 5B**, donde se puede observar que la técnica de Luminex, al igual que lo obtenido por la técnica de ELISA, utilizando el anticuerpo (anti-L) proveniente del hibridoma 2E11B5, como anticuerpo de captura y el anticuerpo proveniente del hibridoma 4D8C6-HRP como anticuerpo de detección, permite detectar el antígeno en muestras de pacientes infectados con PIV (**Figura 5B**) con alta intensidad, los cuales fueron previamente confirmados por Inmunofluorescencia directa en un laboratorio clínico certificado utilizando el panel viral. La **figura 5B**, muestra los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-L de PIV, donde se utilizaron 38 muestras de pacientes diagnosticados como PIV positivo y 8 muestras controles sanos. Además, se utilizó como control positivo pocillos a los que se añadió proteína L-PIV purificada. Los resultados muestran que los anticuerpos anti-PIV son específicos en detectar sólo los pacientes positivos

para PIV y no los sujetos controles. Todas las muestras detectadas como positivas por Luminex son aquellas que muestran un MFI por encima de dos desviaciones estándar del promedio de MFI de los controles sanos.

5

Este ensayo, al igual que en el ensayo de ELISA con muestras de pacientes, demuestra la versatilidad que presentan los anticuerpos provenientes de los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6 de PIV, ya que son capaces de unirse simultáneamente al antígeno sin competir por el sitio de unión o interferir entre sí y detectar la poca disponibilidad del antígeno en la muestra de hisopado nasofaríngeo. Lo más interesante en estos resultados es que se pudo detectar la proteína L, que es una proteína quimera, la cual se construyó en el laboratorio a partir de tres fragmentos conservados de los tres serotipos más prevalente de PIV humano (1, 2 y 3).

Ejemplo 9: Estudio ciego para la detección del antígeno L-PIV en muestras clínicas, obtenidas de pacientes cursando una infección, utilizando anticuerpos monoclonales anti-L de PIV, los cuales forman parte del kit de detección múltiple de virus respiratorios.

Previamente se realizaron ensayos de ELISA en Sándwich donde se conocía el diagnóstico previo de las muestras a evaluar. Posterior a estos ensayos, se realizó un estudio ciego, donde se evaluaron cerca de 150 muestras de hisopados nasofaríngeos, sin conocer el diagnóstico microbiológico. Para todos los ensayos del estudio ciego, se realizaron ELISA en Sándwich donde se utilizó como anticuerpo de captura el anticuerpo anti-L 2E11B5 y el anti-L 4D8C6 como anticuerpo de detección conjugado con HRP. Para todos los ensayo se activaron pocillos de una placa de

ELISA con 3,4 µg/mL (170 ng/pocillo) del anticuerpo anti-L proveniente del hibridoma 2E11B5 de PIV, diluido en PBS 1X, durante 30 minutos a 37°C. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X-Tween20 al 0,05% y posteriormente se bloqueó la placa con 200 µL de PBS 1X/FBS al 10% durante 30 min a 37°C. Se lavó nuevamente y se incubó durante 1 hora a 37°C cada pocillo con 50 µL de hisopados nasofaríngeos de pacientes, los cuales se evaluaron en paralelo por el método de diagnóstico estándar (PCR), denominado de manera rutinaria como "panel viral", y que fueron tratadas como se describe previamente en el ejemplo 6. Como controles se incluyeron: 1) control de especificidad: se utilizaron 50 µL de la proteína BSA (50 ng); 2) control positivo: 50 ng de proteína L-PIV recombinante; 3) Controles negativos: pocillos sin muestra y pocillos bloqueados e incubados con anticuerpo de detección. Posteriormente, se realizaron los 2 lavados correspondientes con PBS 1X-Tween20 0,05% y cada pocillo se incubó por 30 min a temperatura ambiente (≈ 25°C, en oscuridad) con 50 µL del anticuerpo anti-L proveniente del hibridoma 4D8C6, conjugado con HRP (1,8 ng/µL de concentración final). A continuación, se lavó la placa 2 veces más, se reveló con 50 µl de solución TMB y se incubó durante 15 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µL de H₂SO₄ 2N y la lectura de la placa se realizó a 450 nm en un lector de ELISA (modelo Epoch), certificado para diagnóstico clínico.

Los resultados se muestran en la **figura 5A**, donde se observa la capacidad de los anticuerpos de detectar la proteína L en muestras clínicas, siendo que fueron diseñados a partir de una proteína quimera. Se detectaron 5 de 7 pacientes PIV positivos, y a partir de estos resultados se pudo determinar la exactitud diagnóstica de los anticuerpos, la cual se muestra en la tabla 1. En la tabla se observan los dos conceptos que definen a la

exactitud diagnóstica, donde tenemos la especificidad, es decir la capacidad de los anticuerpos de diagnosticar muestras negativas como negativas, sin detectar falsos positivos, y por otro lado, tenemos la sensibilidad, es decir la capacidad de los anticuerpos de diagnosticar como positivas aquellas muestras que realmente lo son, sin diagnosticar falsos negativos. Los resultados expuestos en la tabla muestran un alto porcentaje de especificidad (100%) de los anticuerpos frente a la técnica estándar (PCR) y un bajo porcentaje de sensibilidad (71%), la cual a su vez es alta teniendo en cuenta que los anticuerpos se diseñaron contra una proteína quimérica y no contra la proteína completa que expresa el virus, ya que ésta en su totalidad no es conservada.

Tabla 1. Exactitud diagnóstica de los anticuerpos anti-L-PIV

PIV (N=141)	Diagnóstico por técnica de referencia: PCR		Especificidad	Sensibilidad
Prueba diagnóstica: ELISA	Verdaderos positivos	Falsos positivos	100%	71%
	5	0		
	Falsos negativos	Verdadero negativos		
	2	134		

Ejemplo 10: Detección de proteína L mediante ensayo de ELISA indirecto, utilizando los anticuerpos monoclonales secretados por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6 conjugados con biotina.

En este ejemplo de aplicación se demuestra que el anticuerpo monoclonal específico contra la proteína PB2 puede ser detectado mediante ELISA indirecto.

Para la detección de la proteína L, placas de ELISA se activaron con 50 µL de de 50 ng de proteína L y BSA. Los sitios específicos

se bloquearon con FBS al 10% diluido en PBS 1X. 170 ng (3,4 µg/mL) de los fragmentos Fab de los anticuerpos secretados por los hibridoma 2E11B5 (anti-PIV) y 4D8C6 (anti-PIV), ambos previamente conjugados biotina. Incubación de moléculas de unión a biotina (Estreptavidina), la cual está conjugada con HRP (dilución 1:2000, 75 ng por pocillo) (**figura 6, barra de color gris oscuro, anticuerpo 2E11B5 y barra de color gris claro, anticuerpo 4D8C6**).

10 Ejemplo 10: Ensayo de detección de antígenos de PIV, utilizando fragmentos F(ab')₂ de los anticuerpos monoclonales anti-L de PIV mediante ensayo de ELISA indirecto.

Este ensayo tiene como objetivo demostrar la capacidad de detección de fragmentos de los anticuerpos anti-PIV, producidos por los hibridomas 2E11B5 y 4D8C6, por la proteína quimera L. Previamente al ensayo de ELISA indirecto, se realizó la fragmentación de la molécula de IgG de cada anticuerpo anti PIV. La fragmentación se realizó utilizando el kit "Thermo Scientific™ Kits de preparación de fragmentos F(ab')₂ Pierce™" (#10381214, Thermo Scientific), el cual separa el fragmento F(ab')₂ y el Fc del anticuerpo de interés, mediante el uso de la enzima pepsina que digiere el fragmento Fc y posteriormente se realizan pasos de purificación para separar el fragmento F(ab')₂ del fragmento Fc digerido. Posterior a la fragmentación del anticuerpo, la fracción F(ab')₂ purificada fue comprobada por la técnica de SDS-PAGE teñido con azul de coomassie. Fracciones F(ab')₂ fueron conjugadas con moléculas de biotina utilizando el kit de conjugación rápida, Lightning-Link rapid biotin type A (#370-0010, Expedeon). Teniendo todos los reactivos listos, se llevó a cabo la detección del antígeno mediante la técnica de ELISA indirecto, donde la placa de ELISA se activó con 50 ng de

antígeno L purificado por 1 hora a 37°C. Se incluyeron dos controles negativos, uno sin muestra y otro incubando el pocillo con 50 ng de proteína BSA. Posteriormente, la placa se lavó dos veces con buffer fosfato salino (PBS) 1X/Tween20 0,05%. Luego la
5 placa se bloqueó por 2 horas a 37°C con PBS 1X/ Suero Fetal Bovino (FBS) 10%. Posteriormente se repitieron los lavados y a continuación se incubaron cada uno de los anticuerpos, sin fraccionar y fracciones F(ab')₂ (2E11B5 y 4D8C6) conjugados con biotina, a una concentración final de 3,4 µg/mL (170 ng por
10 pocillo), diluidos en PBS 1X/FBS 10%, por 1 hora a 37°C (cada anticuerpo en una placa independiente). Transcurrido el tiempo de incubación, se repitieron los lavados y se agregó a cada uno de los pocillos con una proteína de unión a biotina (Estreptavidina) marcada con la enzima peroxidasa de rábano
15 (Horseradish peroxidase, HRP) en dilución 1 en 2000 (25 ng/µL por pocillo) en PBS 1X/FBS 10%, por 1 hora a temperatura ambiente (≈ 25°C), en oscuridad. Finalmente, se realizaron los lavados y se reveló con 50 µL de buffer citrato/Tetrametilbenzidina (TMB, 3-3'-5-5'-tetramethylbenzidine, 1mg/mL, Becton Dickinson). Para
20 detener la reacción se adicionaron 50 µL de H₂SO₄ 2N y el resultado se leyó en un lector de ELISA, a 450nm. Para determinar que la reacción del anticuerpo secundario era específica en reconocer al anticuerpo primario y además que la señal obtenida no sea provocada por unión inespecífica del anticuerpo
25 secundario al antígeno, se realizaron controles en los cuales se utilizó solamente el anticuerpo secundario sin anticuerpo primario ni muestra (pocillo sin activar). Otro control para determinar que la reacción del anticuerpo primario es específica para el antígeno, consistió en el uso de los anticuerpos sobre
30 una placa de ELISA que no ha sido activada con el antígeno (sin muestra) o usando los anticuerpos sobre una placa de ELISA que poseía 50 ng de la proteína BSA.

Los resultados muestran que los anticuerpos monoclonales de la invención son capaces de reconocer 50 ng de antígeno purificado, de manera específica, independiente de que se utilice el anticuerpo completo o un fragmento del mismo (**Figura 6, barra de**
5 **color negro, anticuerpo 2E11B5 y barra de color blanco, anticuerpo 4D8C6).**