ANTICUERPO MONOCLONAL QUE SE UNE ESPECÍFICAMENTE A LA PROTEÍNA PB2 DEL VIRUS DE LA INFLUENZA HUMANO (FLU), MÉTODOS Y KITS DE DETECCIÓN DE FLU EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

MEMORIA DESCRIPTIVA

Descripción de la invención

Se presentan anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos que reconocen la proteína PB2 del virus de la influenza humana (Flu), donde dichos anticuerpos monoclonales o fragmentos de estos comprenden una un anticuerpo que comprende 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 un anticuerpo que comprende 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 el anticuerpo puede ser usado como anticuerpo de detección o anticuerpo de captura. Adicionalmente, se proporciona un método de diagnóstico de infección por Flu en una muestra biológica que utiliza los anticuerpos monoclonales en formato de kit de diagnóstico para detectar Flu, donde dicho kit comprende al menos un anticuerpo monoclonal contra Flu de acuerdo a lo descrito previamente.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, que reconocen la proteína PB2 del virus

de la influenza humana, útil para el desarrollo de métodos de diagnóstico de infección de influenza en humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La influenza, es una enfermedad infectocontagiosa de las vías respiratorias provocada por el virus de la influenza humana. Este virus es responsable de producir cuadros clínicos respiratorios graves o leves, afectando principalmente las zonas de la nariz, garganta, bronquios y ocasionalmente los pulmones. En general, los síntomas clínicos de la influenza son parecidos a los de una gripe estacional, sin embargo, los síntomas pueden ser variables y van desde una infección asintomática hasta una neumonía grave que puede provocar la muerte[1]. El virus se transmite con facilidad de persona a persona 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[2].

El virus de la influenza puede ser detectado durante todo el año, pero su detección se incrementa en la temporada otoño-invierno, aunque la época y la duración puede ser variable[3]. Según estadísticas epidemiológicas, en Estados Unidos en el año 2016, 310.000 personas fueron hospitalizadas por presentar complicaciones relacionadas con influenza. En el mismo país, la estadística indica que esta infección provoca alrededor de 89.000 muertes anuales. Desde el punto de vista del costo económico, las pérdidas por virus de influenza humana en Estados Unidos se estima alcanzan un costo anual que va desde los 71 a 150 mil millones de dólares[4].

[1] 1. http://www.who.int/csr/disease/swineflu/faq/es/#doesit
[2] http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=3154&Itemid=2498&lang=es
[3] https://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/season/flu-season.htm
[4] https://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/disease/us_flu-related_deaths.htm

Los métodos de diagnóstico más comunes para la detección de Flu se denominan "pruebas de diagnóstico rápido de influenza" (RIDT), estas pruebas se basan en la detección de antígenos de Flu (inmunoensayo) en muestras de hisopado o aspirado nasofaríngeo. Estas pruebas pueden entregar un resultado en un periodo de 15 a 20 minutos, sin embargo, carecen de sensibilidad y solo confieren un resultado cualitativo (positivo o negativo), que puede ser potencialmente un falso negativo debido a su baja especificidad[5].

Hasta ahora, la técnica estándar para la confirmación de una infección por el virus de la influenza corresponde al análisis molecular de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Por ejemplo, el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del Virus de Influenza Humana desarrollado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) permite la detección *in vitro* del virus de la influenza en muestras de vías respiratorias de pacientes humanos que presentan signos y síntomas de infección respiratoria. Este método detecta los virus de influenza A y B a través de la reacción de partidores contra genes codificantes de proteínas altamente conservadas, tales como la proteína de la matriz (proteína M), nucleoproteína (proteína NP) y proteína no estructural (proteína NS). Este tipo de técnica presenta desventajas en cuanto a su costo y optimización, puesto que para su implementación y puesta en marcha se requiere la adquisición de equipamiento y reactivos especializados de elevado costo, como también personal altamente capacitado.

Otro método común para el diagnóstico, es el aislamiento viral en cultivos celulares. El problema de este tipo de técnica es

[5] https://espanol.cdc.gov/enes/flu/professionals/diagnosis/rapidlab.htm

que se requiere de equipamiento y personal altamente especializado. Por otro lado, es un método lento que puede entregar resultados diagnósticos dentro de 5 a 14 días luego de su inicio.

En la práctica del diagnóstico clínico, una de las principales dificultades o problemáticas es la muestra misma, puesto que se puede acceder a una cantidad limitada de ella, la que además presenta una baja concentración de antígeno y que incluye la presencia de otras proteínas y componentes celulares que pueden interferir en la reacción de detección.

Se han descrito previamente anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos del virus de la influenza humana. En el documento WO2012045001 (A2), por ejemplo, se divulga un anticuerpo monoclonal humano que se une a la proteína de superficie hemaglutinina. En el documento US9650434B2 se provee de un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se puede unir específicamente al dominio HA1 de la proteína hemaglutinina del subtipo H1 y subtipo H5 de virus de influenza. En ambos documentos, la solución propuesta apunta a la detección de un antígeno diferente de la proteína PB2, y no se demuestra la eficiencia, especificidad y sensibilidad de la unión antígeno-anticuerpo en muestras clínicas.

En cuanto a la detección de la proteína PB2 de Flu, el documento JP2015189715 (A) proporciona un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la subunidad PB2 de la ARN polimerasa dependiente de ARN. Las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y regiones variables de la cadena liviana del anticuerpo allí descrito difieren sustancialmente de las secuencias de los anticuerpos monoclonales parte de la invención. Por otro lado, en JP2015189715 (A) no se realizan ensayos de detección de antígeno

en muestras clínicas de humano, ni se determinan las características de especificidad y sensibilidad de los anticuerpos en el contexto del diagnóstico clínico. Recordemos que en condiciones de diagnóstico clínico se recurre a muestras biológicas que incluyen muy bajas concentraciones de antígeno, lo que dificulta la especificidad y sensibilidad de la reacción antígeno-anticuerpo.

Se requiere entonces, de una nueva alternativa de diagnóstico del virus de la influenza humana que, a diferencia de las pruebas de diagnóstico molecular y de cultivo celular que conllevan mayores tiempos de respuesta y un elevado costo para su implementación y mantención, permita la detección de una amplia variedad de tipos y subtipos de influenza de forma rápida, sensible, específica y a un menor costo. Además, aun cuando hasta ahora se han propuesto anticuerpos monoclonales para la detección de otras proteínas de Flu e incluso contra PB2, estos anticuerpos sólo han sido evaluados en modelos murinos y no corresponden en ningún caso a una solución al problema técnico planteado.

De acuerdo con los antecedentes provistos, se proponen anticuerpos monoclonales que detectan la proteína PB2 para ser utilizados en la detección y diagnóstico rápido, eficaz y certero en pacientes infectados con Flu, donde dichos anticuerpos detectan específicamente la proteína en muestras clínicas a muy bajas concentraciones del antígeno específico (alta sensibilidad), incluso distinguiendo el antígeno viral específico en muestras clínicas que incluyen incluso antígenos de otros virus respiratorios. Adicionalmente, los anticuerpos provistos pueden formar parte de un método de diagnóstico y kit para el diagnóstico de Flu, donde cada uno de los anticuerpos

puede ser utilizado de forma versátil tano como anticuerpo de detección como anticuerpo de captura.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína PB2 o fragmentos de ésta, del virus de influenza humana. De forma particular, la invención corresponde a anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos secretados por líneas celulares de hibridomas denominados 1A3E2 y 2F11B1, que reconocen la proteína PB2 del virus de la influenza humana (Flu), donde dichos anticuerpos monoclonales o fragmentos de estos comprenden una un anticuerpo que comprende 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 un anticuerpo que comprende 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 el anticuerpo puede ser usado como anticuerpo de detección o anticuerpo de captura. Adicionalmente, se proporciona un método de diagnóstico de infección por Flu en una muestra biológica que utiliza los anticuerpos monoclonales en formato de kit de diagnóstico para detectar Flu, donde dicho kit comprende al menos un anticuerpo monoclonal contra Flu de acuerdo a lo descrito previamente.

Los anticuerpos descritos en la invención 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 PB2 de Flu respecto de otros antígenos virales, por ejemplo contra la proteína pIII de adenovirus, se demuestra en los resultados provistos en las figuras 1A, 1B y 1C. A partir de estos resultados es posible concluir que los anticuerpos provistos en el alcance de la presente solicitud sólo reconocen a la proteína PB2 de Flu, y que en ensayos de ELISA con antígenos del virus ADV 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 PB2 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.

En tercer lugar, permiten detectar la proteína PB2 o fragmentos de ésta con alta sensibilidad en muestras que contengan escasa cantidad de antígeno, como muestras de hisopado nasofaríngeo por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales propuestos son capaces de detectar a la proteína PB2, una proteína altamente conservada. La estrategia de detección de una proteína viral conservada permite que los anticuerpos parte del alcance de la invención detecten diferentes tipos de influenza humana, entre ellos, influenza A, B y C.

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 1A3E2 y 2F11B1.

Los anticuerpos monoclonales descritos pueden ser utilizados para ensayos de detección, diagnóstico y/o determinación de infección por Flu. 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 Flu en una muestra biológica, el cual comprende poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo monoclonal contra la proteína PB2 de Flu 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 Flu, secreciones nasales, lavados nasales, líquido cefalorraquídeo, secreciones faríngeas y/o lavados o secreciones bronquiales. Como parte del método, el ensayo utilizado para la 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 detectar al virus de la influenza humana, el que comprende: un anticuerpo monoclonal contra la proteína PB2 de Flu 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 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 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, 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 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).

Descripción de las figuras de la invención

Figura 1: Detección de proteína PB2 de Flu por los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1, mediante un ensayo de ELISA indirecto. La placa fue activada con 50 ng de proteína PB2 de Flu recombinante purificada, 50 ng de proteína pIII de ADV (como control de especificidad) y 20 µg de células MDCK no infectadas (utilizadas como control de especificidad) e infectadas con Flu. 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 anticuerpos anti-PB2 provenientes del hibridoma 1A3E2, en cantidad de 170 ng (**A**), el hibridoma 2F11B1 en cantidad de 170 ng (**B**) y el anticuerpo policlonal comercial Anti-Influenza A virus PB2 protein antibody, número de catálogo GTX125926 (GeneTex) utilizado en cantidad de 170 ng (**C**). Los datos mostrados en el gráfico expresan la absorbancia (en OD, densidad óptica) detectada a 450 nm, emitida por la conversión del sustrato Tetrametilbenzidina a un compuesto coloreado, catalizada por la enzima Horseradish peroxidase (HRP) conjugada en un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón que se unió específicamente a los anticuerpos secretados por los hibridomas 1A3E2, 4D8C6 y GTX125926 de GeneTex. Los valores corresponden al promedio +/- la desviación estándar de la absorbancia emitida por cada muestra en al menos dos experimentos independientes. Donde, * $P<0.05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ y **** $P<0,0001$ por el test de student paramétrico comparado los resultados de la proteína pIII-ADV versus los de PB2-Flu, y por otro lado comparando las células no infectadas versus infectadas.

Figura 2: Determinación de sensibilidad de anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1 en la detección de la proteína PB2 de Flu. Placas de ELISA se activaron con diluciones seriadas 1:2, iniciando con 50 ng de proteína PB2 y finalizando con 0,04 ng. Posteriormente, los pocillos se incubaron con los anticuerpos anti-PB2 provenientes del hibridoma 1A3E2, en cantidad de 170 ng (**A**) y el hibridoma 2F11B1 en 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) conjugada a los anticuerpos anti-PB2 provenientes de los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1 en cantidad de 170 ng (**A** y **B**). Los valores corresponden al promedio +/- la desviación estándar de la absorbancia emitida por cada muestra en al menos dos experimentos independientes. * *P*<0,05; ** *P*<0,01; *** *P*<0,001 por el test de student paramétrico comparando los resultados del pocillo denominado control versus cada una de las diluciones de la proteína PB2.

Figura 3: Ensayo de diluciones seriadas de los anticuerpos monoclonales anti-PB2 de Flu producidos por los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1, para la detección de antígenos purificados de Flu. Se activaron placas de ELISA con 50 ng de proteína recombinante PB2 de Flu y se detectó el antígeno con 11 diluciones seriadas 1:2 de los anticuerpos anti-PB2 1A3E2 **(A)** ó 2F11B1 **(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 versus cada una de las diluciones de la proteína PB2.

Figura 4: Detección de Flu en muestras clínicas mediante ELISA en Sándwich, utilizando la combinación de los anticuerpos monoclonales secretados por los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1. Placas de ELISA fueron activadas con 170 ng de anticuerpo secretado por el hibridoma 1A3E2 (anti-Flu), funcionando como anticuerpo de captura. Los pocillos activados con el anticuerpo de captura se incubaron con 50 μl de muestras de hisopado nasofaríngeo (HNF) de pacientes que presentaban cuadros respiratorios virales. Como controles negativos se analizaron 10

muestras de controles sanos. Se utilizaron 12 muestras de pacientes positivos para Flu y como control de especificidad, se incluyeron 3 muestras de pacientes positivos para el virus Parainfluenza. Como control positivo se incluyeron pocillos a los que se añadió proteína recombinante PB2-Flu purificada. Para la detección de la proteína capturada por el anticuerpo 1A3E2, se utilizaron los anticuerpos producidos por el hibridoma 2F11B1, conjugados a la enzima Horseradish Peroxidase, en una dilución 1:2000 (1,8 ng/μl por pocillo). Los datos mostrados es la mediana del valor de la absorbancia emitida a 450 nm de cada muestra (**P<0,01 **** y P <0,0001; mediante el test de student no paramétrico y post test de Mann Whitney comparando pacientes positivos de Flu versus controles sanos, y frente a los virus usados como control de especificidad).

Figura 5: Detección de proteína PB2 mediante ensayo de ELISA indirecto, utilizando los anticuerpos monoclonales completos y fragmentos de ellos, secretados por los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1 conjugados con biotina. Se observa la detección de la proteína PB2 de los anticuerpos conjugados con Biotina. En negro y blanco se indican fragmentos del anticuerpo secretados por los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1 respectivamente. Mientras que en gris se presenta la actividad de los fragmentos completos de los anticuerpos secretados por los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1 respectivamante. 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). Se muestra el promedio del valor de la absorbancia emitida a 450 nm de cada muestra (donde b es igual a p<0,0001 comparado con a; 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.

Ejemplo 1: Determinación de la secuencia nucleotídica que codifica las cadenas livianas (VL) y pesadas (VH) de la región variable del anticuerpo anti PB2 Flu secretado por el hibridoma 1A3E2.

El hibridoma 1A3E2 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% CO_2, hasta una densidad celular de 700.000 células/mL. Se obtuvo el RNA total de 3,5 x10^6 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 PrimeScriptTM 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 aminoacídicas de las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos secretados por el hibridoma 1A3E2 fueron identificadas por las CDRs de su cadena liviana correspondientes a CDR1 (CDR_{LC1}) que se define según la SEQ ID NO: 1, su CDR2

(CDR_{LC2}) que se define por la SEQ ID NO: 2 y su CDR3 (CDR_{LC3}) que corresponde a la SEQ ID NO: 3, y las CDRs de su cadena pesada correspondientes a CDR1 (CDR_{HC1}) que se define según la SEQ ID NO: 4, su CDR2 (CDR_{HC2}) que corresponde a la SEQ ID NO: 5 y su CDR3 (CDR_{HC3}) que corresponde a la SEQ ID NO: 6.

Ejemplo 2: Determinación de la secuencia nucleotídica que codifica las cadenas livianas (VL) y pesadas (VH) de la región variable del anticuerpo anti PB2 Flu secretado por el hibridoma 2F11B1.

El hibridoma 2F11B1 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% CO_2, hasta una densidad celular de 700.000 células/mL. Se obtuvo el RNA total de 3,5 x10^6 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 PrimeScriptTM 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. A partir de esto, se determinaron las secuencias aminoacídicas de las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos secretados por el hibridoma 2F11B1 fueron identificadas por las CDRs de su

cadena liviana correspondientes a CDR1 (CDR_{LC1}) que se define según la SEQ ID NO: 7, su CDR2 (CDR_{LC2}) que se define por la SEQ ID NO: 8 y su CDR3 (CDR_{LC3}) que corresponde a la SEQ ID NO: 9, y las CDRs de su cadena pesada correspondientes a CDR1 (CDR_{HC1}) que se define según la SEQ ID NO: 10, su CDR2 (CDR_{HC2}) que corresponde a la SEQ ID NO: 11 y su CDR3 (CDR_{HC3}) que corresponde a la SEQ ID NO: 12.

Ejemplo 3: Ensayo de detección de antígenos de Flu, determinación de especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-PB2 de Flu para antígenos purificados de Flu mediante ensayo de ELISA indirecto.

Este ensayo tiene como objetivo demostrar la especificidad por la proteína PB2 de Flu de los anticuerpos producidos por los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1. 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 celular de células MDCK no infectadas (como control negativo) e infectadas con virus Flu serotipo A. Otro control negativo incluido fue 50 ng de proteína pIII de ADV 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 (1A3E2 y 2F11B1) 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). Bajo las mismas condiciones, en una placa diferente, se realizó un ensayo control utilizando un anticuerpo monoclonal comercial que reconoce la proteína PB2 de Flu (Anti-

Influenza A virus PB2 protein antibody, número de catálogo GTX125926, GeneTex) a una concentración de 3,4 μg/mL. Transcurrido el tiempo de incubación, se repitieron los lavados y se agregó a cada uno de los pocillos un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con la enzima peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase, HRP) en dilución 1 en 2000 (1,8 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/tetrametil-benzidina (TMB, 3-3'-5-5'tetramethylbenzidine, 1mg/mL, Becton Dickinson). Para detener la reacción se adicionaron 50 µL de H_2SO_4 2N y el resultado se leyó en un lector de ELISA, a 450nm. Para determinar que la reacción del anticuerpo secundario era especifica 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 pIII de ADV ó células no infectadas. 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 pIII de ADV, ni proteínas de células no infectadas (**Figura 1A y 1B**). Por otro lado se observó que el anticuerpo comercial (**Figura 1C**) utilizado en el ensayo como control, aunque fue específico para la detección sólo de las células infectadas, no fue eficiente en detectar la proteína PB2 de Flu recombinante purificada en nuestro laboratorio. Todos los

controles negativos utilizados entregaron resultados esperados (datos no mostrados en las figuras).

Ejemplo 4: Ensayo para determinar la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos virales anti-PB2 de Flu.

El ensayo se realizó para determinar la máxima dilución de proteína que los anticuerpos monoclonales anti-PB2 de Flu provenientes de los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1 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 PB2 de Flu, partiendo con 50 ng de antígeno purificado. Los anticuerpos anti-PB2 1A3E2 ó 2F11B1, se utilizaron en una concentración de 3,4 μg/mL(170 ng/pocillo), diluidos en PBS 1X/FBS 10%. Posteriormente se adicionó el anticuerpo de detección anti-IgG de ratón en una dilución de 1:2.000 (1,8 ng/μl por pocillo) y se incubo 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'tetrametilbenzidina, 1mg/mL, Becton Dickinson). Para detener la reacción se adicionaron 50 µL de H_2SO_4 2N y el resultado se leyó en un lector de ELISA, a 450nm. Los resultados mostraron que el anticuerpo anti-PB2 1A3E2 es capaz de reconocer hasta 780 picogramos (pg) de la proteína PB2 de Flu (**Figura 2A**). El anticuerpo anti-PB2 proveniente del hibridoma 2F11B1, mostró la misma sensibilidad que el anticuerpo anti-PB2 1A3E2 (**Figura 2B**). 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 PB2 Flu, datos no mostrados en los gráficos).

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

El ensayo se realizó para determinar la máxima dilución de los anticuerpos monoclonales anti-PB2 de Flu provenientes de los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1, que permiten la detección del antígeno viral. Para esto, se activó la placa con 50 ng de antígeno purificado (proteína PB2) y luego la placa se bloqueó por 2 horas a 37°C con PBS 1X/ Suero Fetal Bovino (FBS) 10%. Los anticuerpos anti-PB2 1A3E2 ó 2F11B1 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 1:2000 (1,8 ng/µl por pocillo) se incubo 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'tetrametil-benzidina, 1mg/mL, Becton Dickinson). Para detener la reacción se adicionaron 50 µL de H_2SO_4 2N y el resultado se leyó en un lector de ELISA, a 450 nm. En la **figura 3** se observa que el anticuerpo anti-PB2 1A3E2 puede detectar 50 ng del antígeno purificado hasta con 1,3 ng por pocillo (**Figura 3A**). Por otro lado, el clon anti-PB2 2F11B1 es más eficiente que el clon 1A3E2, ya que reconoce 50 ng de PB2 purificada con casi todas las diluciones realizadas (**Figura 3B**). El control negativo incluido en este ensayo, corresponde a un pocillo que no contiene muestra (proteína PB2), fue bloqueado con PBS 1X/FBS 10%, se le adicionó anticuerpo primario (anti-PB2 1A3E2 ó anti-PB2 2F11B1) y contiene además anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP.

Ejemplo 6: Diagnóstico clínico de muestras de pacientes infectados con Flu, utilizando anticuerpos monoclonales anti-PB2 de Flu, mediante la técnica de ELISA en Sándwich.

La disponibilidad y la concentración de las proteínas virales generalmente es muy escasa en muestras clínicas de hisopados nasofaríngeos, por lo que fue necesario modificar el ensayo de ELISA realizado previamente. Para este ensayo se realizó un ELISA en Sándwich, usando como anticuerpo de captura el anticuerpo anti-PB2 proveniente del hibridoma 1A3E2 de Flu y como anticuerpo de detección el clon anti-PB2 2F11B1 de Flu. El anticuerpo de detección anti-PB2 2F11B1 de Flu, 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-PB2 proveniente del hibridoma 1A3E2 para Flu, el cual se diluyó en PBS 1X, y se incubó 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 (previamente tratados) de pacientes positivos para Flu 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 PIV mediante el panel viral para los anticuerpos anti-Flu; 2) control positivo: 50 ng de proteína PB2-Flu 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 con 50 μL del anticuerpo anti-PB2

proveniente del hibridoma 2F11B1 conjugado con HRP (concentración final de 1,8 ng/μl por pocillo). Los anticuerpos de detección se incubaron 1 hora a temperatura ambiente (≈ 25°C), en oscuridad. 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 H_2SO_4 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 4A**, donde se puede observar que la técnica de ELISA en Sándwich utilizando el anticuerpo (anti-PB2) proveniente del hibridoma 1A3E2, como anticuerpo de captura y el anticuerpo proveniente del hibridoma 2F11B1-HRP como anticuerpo de detección, permite detectar el antígeno en muestras de pacientes infectados con Flu (**Figura 4A**), los cuales fueron previamente confirmados por Inmunofluorescencia directa en un laboratorio clínico certificado utilizando el panel viral. La **figura 4A**, muestra los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-PB2 de Flu, donde se utilizaron 12 muestras de pacientes diagnosticados como Flu positivo y como control de especificidad, se incluyeron 3 muestras de pacientes positivos para el virus Parainfluenza. Como control positivo se incluyeron pocillos a los que se añadió proteína recombinante PB2-Flu purificada. Como control negativo se utilizaron 10 controles sanos. Los resultados muestran que los anticuerpos son específicos en detectar sólo los pacientes positivos para Flu y no los controles sanos o los infectados con otro virus (PIV). Todas las muestras detectadas positivas por ELISA son aquellas que muestran una densidad óptica (OD) por encima de 0,15.

Este ensayo demuestra la versatilidad que presentan los anticuerpos provenientes de los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1 anti-

PB2 de Flu, ya que son capases de unirse simultáneamente al antígeno sin competir por el sitio de unión ó interferir entre sí. Lo anterior permite la captura y posterior detección de la proteína PB2 en muestras de pacientes.

Tratamiento de muestras clínicas. Las muestras que se utilizaron para los ensayos fueron obtenidas a partir de hisopados nasofarígeos 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.

Es de suma importancia, utilizar ambos anticuerpos para la detección de la proteína PB2, debido a la baja disponibilidad de antígeno en la muestra. Utilizando un ELISA en Sándwich se incrementa la especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de Flu. Se realizaron ensayos donde se activó la placa directamente con muestras clínicas de hisopados nasofaríngeos, luego se incubaron los anticuerpos anti-PB2 1A3E2 y anti-PB2 2F11B1, por separado. Luego se incubó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP y se evaluó la absorbancia generada al incubar el complejo de anticuerpos más muestra con el sustrato TMB, y no se observó un diagnóstico positivo ya que la señal entregada era muy baja (datos no mostrados).

Realizar un kit diagnóstico utilizando la técnica de ELISA en Sándwich, donde la placa pueda venir activada y bloqueada,

disminuiría el tiempo y el costo de realizar diagnóstico, ya que esta técnica es fácil de realizar y analizar en comparación a la técnica estándar (PCR). El kit no necesita de personal altamente capacitado para realizarlo o analizarlo.

Ejemplo 7: Diagnóstico clínico de muestras de pacientes infectados con FLU, utilizando anticuerpos monoclonales anti-PB2 de FLU, 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 4A**). Para este ensayo se realizó un ensayo de luminex tipo Sandiwch, usando como anticuerpo de captura el anticuerpo anti-PB2 1A3E2 como anticuerpo de captura y el anti-PB2 2F11B1 como anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección anti-PB2 2F11B1 de FLU, se conjugó con el fluorósforo 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 1A3E2 (anti-FLU), 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 (≈ 23 °C), en agitación a 400 rpm y en oscuridad (tapados con papel de aluminio). Como controles negativos se analizaron 8 muestras de controles sanos. Se utilizaron 19 muestras de pacientes positivos para FLU (de acuerdo con el método de diagnóstico "D^3 Ultra DFA Respiratory Virus Screening and ID Kit de DHI (Diagnostics Hibryds) USA",

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 PB2-FLU purificada (50 ng). Pasada las 2 horas, se 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 1A3E2, se utilizaron los anticuerpos producidos por el hibridoma 2F11B1, conjugados al fluoróforo biotina, a una concentración de 4 μg/mL 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 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 μg/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 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 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 4B**, donde se puede observar que la técnica de Luminex, al igual que lo obtenido por la técnica de ELISA, utilizando el

anticuerpo (anti-PB2) proveniente del hibridoma 1A3E2, como anticuerpo de captura y el anticuerpo proveniente del hibridoma 2F11B1-HRP como anticuerpo de detección, permite detectar el antígeno en muestras de pacientes infectados con FLU (**Figura 4A**) con alta intensidad, los cuales fueron previamente confirmados por Inmunofluorescencia directa en un laboratorio clínico certificado utilizando el panel viral. La **figura 4B**, muestra los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-PB2 de FLU, donde se utilizaron 19 muestras de pacientes diagnosticados como FLU positivo y 6 muestras de controles sanos. Además, se utilizó como control positivo pocillos a los que se añadió proteína PB2-FLU purificada. Los resultados muestran que los anticuerpos anti-PB2 son específicos en detectar sólo los pacientes positivos para FLU 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.

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 1A3E2 y 2F11B1 de FLU, ya que son capases 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.

Ejemplo 8: Estudio ciego para la detección del antígeno PB2-FLU en muestras clínicas, obtenidas de pacientes cursando una infección, utilizando anticuerpos monoclonales anti-PB2 de FLU, 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 160 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 1A3E2 y el anti-L 2F11B1 como anticuerpo de detección conjugado con HRP. Para todos los ensayos se activaron pocillos de una placa de ELISA con 3,4 μg/mL (170 ng/pocillo) del anticuerpo anti-L proveniente del hibridoma 1A3E2 de FLU, 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 PB2-FLU 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-PB2 proveniente del hibridoma 2F11B1, 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 H_2SO_4 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 4A**, donde se observa la capacidad de los anticuerpos de detectar la proteína PB2 en muestras clínicas, siendo que fueron diseñados a partir de una proteína quimera. Se detectaron 18 de 21 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 (94%) y de sensibilidad (86%) de los anticuerpos frente a la técnica estándar (PCR).

Tabla 1. Exactitud diagnóstica de los anticuerpos anti-PB2-FLU

PIV (N=160)	**Diagnóstico por técnica de referencia: PCR**		**Especificidad**	**Sensibilidad**
Prueba diagnóstica: ELISA	**Verdaderos positivos**	**Falsos positivos**	100%	86%
	18	9		
	Falsos negativos	**Verdadero negativos**		
	3	130		

Ejemplo 9: Detección de proteína PB2 mediante ensayo de ELISA indirecto, utilizando los anticuerpos monoclonales completos y fragmentos de ellos.

En este ejemplo de aplicación se demuestra que tanto el anticuerpo monoclonal específico contra la proteína PB2 puede ser detectado mediante ELISA indirecto. Para esto, placas de ELISA fueron activadas con 50 μL de de 50 ng de proteína PB2 y BSA. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con FBS al 10% diluido en PBS 1X. 170 ng (3,4 μg/mL) de los fragmentos Fab de los anticuerpos secretados por el hibridoma 1A3E2 (anti-Flu) y 2F11B1 (anti-Flu), 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 5, barra de color gris oscuro, anticuerpo 1A3E2 y barra de color gris claro, anticuerpo 2F11B1**).

Ejemplo 10: Ensayo de detección de antígenos de Flu, utilizando fragmentos F(ab')$_2$ de los anticuerpos monoclonales anti-PB2 de Flu mediante ensayo de ELISA indirecto

Este ensayo tiene como objetivo demostrar la capacidad de detección de fragmentos de los anticuerpos anti-Flu, producidos por los hibridomas 1A3E2 y 2F11B1, por la proteína PB2. Previamente al ensayo de ELISA indirecto, se realizó la fragmentación de la molécula de IgG de cada anticuerpo anti Flu. 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 western blot. 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 PB2 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 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 $F(ab')_2$ (1A3E2 y 2F11B1) conjugados con biotina, 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 con una proteína de unión a biotina (Estreptavidina) marcada con la enzima peroxidasa de rábano (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 detener la reacción se adicionaron 50 μL de H_2SO_4 2N y el resultado se leyó en un lector de ELISA, a 450nm. Para determinar que la reacción del anticuerpo secundario era especifica en reconocer al anticuerpo primario y además que la señal obtenida no sea provocada por unión inespecífica del anticuerpo 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 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 5, barra de color negro, anticuerpo 1A3E2 y barra de color blanco, anticuerpo 2F11B1**).