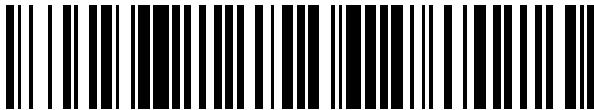


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 020 525**

(21) Número de solicitud: 202330955

(51) Int. Cl.:

**C07K 16/08** (2006.01)  
**A61P 31/22** (2006.01)

(12)

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

**21.11.2023**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**22.05.2025**

(71) Solicitantes:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (57.50%)**  
Avenida de la Constitución 18  
41071 Sevilla (Sevilla) ES;  
**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (37.50%) y**  
**UNIVERSIDAD DE GRANADA (5.00%)**

(72) Inventor/es:

**GARCÍA SALCEDO, José Antonio;**  
**SORIANO RODRÍGUEZ, Miguel;**  
**LINDE RODRÍGUEZ, Ángel;**  
**RAMÍREZ MACÍAS, Inmaculada;**  
**ORTÍZ GONZÁLEZ, Matilde;**  
**SÁNCHEZ MARTÍN, Victoria;**  
**SORIANO LERMA, Ana Del Carmen;**  
**PÉREZ CARRASCO, Virginia y**  
**NAVARRO MARÍ, José María**

(74) Agente/Representante:

**SAN MARTÍN ALARCIA, Esther**

### Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

(54) Título: **Nanoanticuerpo contra el virus del Herpes Simple tipo 1**

(57) Resumen:

La presente invención describe un nanoanticuerpo específico frente al virus del Herpes simple tipo 1, con efecto inhibidor frente a dicho virus, y describe su uso tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de la infección causada por dicho virus. También se describe el proceso de elaboración del nanoanticuerpo.

## DESCRIPCIÓN

### **Nanoanticuerpo contra el virus del Herpes Simple tipo 1**

### **CAMPO TÉCNICO DE INVENCIÓN**

La presente invención se enmarca en el campo de la medicina, la inmunología, 5 biotecnología y la virología, y más concretamente, se refiere al tratamiento de enfermedades infecciosas transmitidas por virus mediante técnicas de inmunología. En concreto, describe un nanoanticuerpo específico frente al virus del Herpes simple tipo 1 para su uso tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de la infección causada por dicho virus.

### **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

10 El virus del Herpes simple (o “HSV” por sus siglas en inglés) es la causa de una de las infecciones más comunes a nivel mundial. Se divide en dos tipos de virus: el Herpes simple tipo 1 (HSV-1) y Herpes simple tipo 2 (HSV-2). El virus HSV-1 se transmite principalmente por contacto oral y causa herpes orales y labiales, y con menor frecuencia también puede causar el herpes genital. El virus HSV-2 se transmite por contacto sexual y causa el herpes 15 genital. Tanto el herpes oral como el genital son en su mayoría asintomáticos, pero pueden causar ampollas o úlceras dolorosas. La infección dura toda la vida y los síntomas pueden reaparecer después de muchos años.

Según los últimos datos, se estima que el 67% de la población mundial está infectada con HSV-1 y muchas de estas infecciones son adquiridas durante la niñez. Además, se estima 20 que sólo en Estados Unidos, este número se incremente en más de 600.000 nuevas infecciones por año para 2050.

La infección con el HSV-1 puede producir complicaciones en el caso de personas inmunodeprimidas, donde el virus puede cursar con síntomas más severos y la reactivación del virus es más frecuente. Además, hay casos en los que la infección por HSV-1 puede 25 originar incluso problemas graves como encefalitis o queratitis.

El HSV pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* y género *Simplexvirus*. Está formado por un núcleo que contiene ADN lineal de doble cadena. Este genoma está encapsulado dentro de una cápside icosaédrica o nucleocápside la cual está rodeada por una capa de proteínas, llamada tegumento, involucradas en la replicación del 30 virus en la célula hospedadora.

En la envoltura más externa hay cuatro proteínas de membrana de gran importancia: la glicoproteína trimérica B (gB), las glicoproteínas de unión al receptor C y D (gC y gD) y el heterodímero gH/gL, que median la entrada en la célula hospedadora a través de la interacción con sus proteínas de superficie. A diferencia de otros virus, los herpesvirus codifican las funciones de unión a receptores y de fusión de membranas mediante proteínas diferentes.

La gB es una proteína transmembrana trimérica con cinco dominios extracelulares. La gB es la proteína de fusión viral, responsable de la inserción en la membrana de la célula hospedadora y la impulsora de la fusión de la envoltura viral y la membrana celular.

- 10 La infección por el HSV-1 presenta 2 etapas principales: una primera de unión del virus a la superficie celular, y una segunda donde se fusiona con la membrana plasmática. La unión a la superficie celular tiene lugar a través de receptores celulares específicos de la envoltura viral, como la gB y gC, que se unen al proteoglicano “sulfato de heparán” de la superficie celular. Por su parte, la gD se une específicamente al menos a uno de los tres receptores de entrada 15 conocidos: el mediador de entrada de herpesvirus (HVEM), la nectina -1 o el sulfato de heparán 3-O sulfatado. En la siguiente etapa de fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática de la célula se ven implicadas las glicoproteínas gB, gD, gH y gL.

Por tanto, se puede decir que en el HSV-1 el complejo formado por el dímero de gD, el heterodímero gH/gL y el trímero gB son necesarios y suficientes para la entrada del virus a 20 la célula. La unión de gD al receptor de entrada desplaza el extremo carboxilo terminal del ectodominio gD y transmite una señal al complejo gH/gL que a su vez activa la proteína de fusión gB para insertar bucles de fusión hidrofóbicos en la membrana celular [1, 2]

Además de las glicoproteínas implicadas en la entrada, hay otras proteínas componentes del virión implicadas en el desarrollo de la infección. Entre ellas destacan: vhs (región única larga 25 41 o U<sub>L</sub>41) implicada en la inducción de la inhibición de la síntesis de proteínas del huésped, VP16 que impide la degradación de los ARNm virales, o la proteína quinasa U<sub>L</sub>13 (región única larga 13) cuya ausencia bloquea la infección.

Actualmente existen distintos tratamientos que ayudan a reducir la gravedad y frecuencia de los síntomas causados por el HSV-1, pero estos tratamientos no curan la infección, por lo 30 que las personas que están infectadas por el HSV-1 se ven obligadas a adaptarse a vivir con la infección.

- Los principales fármacos utilizados son los antivirales aciclovir (fármaco de elección preferente), famciclovir y valaciclovir. Todos ellos pertenecen al grupo de los análogos de nucleósidos. Estos análogos son una clase importante de agentes antivirales que se usan frecuentemente frente a las infecciones de distintos virus, entre ellos el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus del herpes simple (HSV). Los análogos de nucleósidos están involucrados en la replicación del ADN y son utilizados por las polimerasas virales, pero no por las humanas. El aciclovir es fosforilado intracelularmente por las quinasas virales y el trifosfato resultante compite con la guanosina para incorporarse al ADN viral bloqueando la actividad de la ADN polimerasa viral. El uso del aciclovir para tratar infecciones causadas por el virus del Herpes simple se aprobó 1982. Se puede administrar por vía tópica o sistémica. La dosis oral recomendada es de 200 a 800 mg tres o cinco veces al día durante 5 a 10 días y la dosis intravenosa típica para infecciones graves es de 5 a 10 mg/kg cada 8 horas durante 5 a 10 días.
- Actualmente la Organización Mundial de la Salud tiene programas de trabajo para aumentar la conciencia sobre la infección por virus del Herpes simple y mejorar el acceso a los medicamentos antivirales. También apoya la investigación para desarrollar nuevas estrategias de prevención y control de las infecciones, lo que demuestra la importancia y necesidad de nuevas alternativas a los tratamientos existentes.
- Los anticuerpos o inmunoglobulinas son moléculas compuestas por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). En 1993, el profesor Raymond Hamers publicó que las especies de la familia *Camelidae* contenían una fracción de anticuerpos funcionales compuestos únicamente por cadenas pesadas (*Heavy chain Antibodies* o “HcAbs”). Estos HcAbs son homodímeros donde cada monómero tiene un fragmento de unión al antígeno (fragmento Fab) reducido a un solo dominio variable (VHH o nanobody). Estos fragmentos de anticuerpos, derivados de los HcAbs, también se denominan anticuerpos monocatenarios, nanoanticuerpos, nanocuerpos, anticuerpos de dominio simple, anticuerpos VHH o “*nanobodies*” en inglés. En la presente memoria nos referiremos a ellos como nanoanticuerpos.
- La cadena H de los nanoanticuerpos está compuesta por 3 dominios globulares: el VHH, una región bisagra y dos dominios constantes de Fc (CH2 y CH3). Estos dominios Fc son altamente homólogos a los dominios Fc de los anticuerpos convencionales. La organización del dominio variable de la cadena H del anticuerpo convencional (dominio VH) y el dominio VHH es similar: ambos están compuestos por cuatro secuencias conservadas, las regiones

marco (FR), que flanquean a tres regiones hipervariables (HV) o regiones determinantes de la complementariedad (CDR).

Sin embargo, hay algunas diferencias claras en la alineación de las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VHH: las regiones CDR1 y CDR3 de VHH son más amplias que las de VH, la secuencia VHH lleva sustituciones importantes de aminoácidos altamente conservados ubicados en la región marco-2 (FR2); los residuos hidrofóbicos Val42, Gly49, Leu50 y Trp52 en VH de anticuerpos convencionales son sustituidos en el VHH de anticuerpos monocatenarios por los residuos hidrofílicos Phe/Tyr42, Glu49, Arg/Cys50 y Leu/Gly52. La presencia de aminoácidos más hidrofílicos en VHH les confiere una mayor solubilidad a estos anticuerpos.

Los nanoanticuerpos son los fragmentos de unión a antígeno más pequeños que se conocen (2.5 nm de diámetro y 4 nm de longitud) generados a través de la tecnología de ADN recombinante. Su aislamiento abrió la puerta a generar anticuerpos monocatenarios completamente activos, estables, solubles, específicos, que presentan alta afinidad, que no son inmunogénicos y que se pueden humanizar.

Los nanoanticuerpos tienen propiedades únicas como la capacidad de reconocer epítopos no reconocidos por otros anticuerpos y su estabilidad mejorada. Además, se han utilizado con éxito en enfoques terapéuticos como bloqueantes de receptores asociados a diferentes enfermedades o virus patógenos. Para la administración a humanos es necesario humanizar estos nanoanticuerpos, tal como se ha hecho para el caso del Caplacizumab, el primer medicamento aprobado desarrollado con un nanoanticuerpo [3].

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La presente memoria describe una invención basada en el desarrollo de un nanoanticuerpo específico para su uso en el diagnóstico y el tratamiento de la infección causada por HSV-1.

El nanoanticuerpo de la invención se une a la gB del virus promoviendo la neutralización de la infección viral del HSV-1. La gB tiene un papel relevante como parte de la maquinaria de infección del virus tal y como se ha señalado con anterioridad, dado que la infección del virus está estrechamente ligada a la presencia de dicha proteína. La unión entre el nanoanticuerpo de la invención y la gB afecta a la inserción de bucles de fusión hidrofóbicos en la membrana celular limitando la capacidad infectiva del HSV-1.

Por tanto, el mecanismo de acción en el que se basa la inhibición de la infección por HSV-1 difiere totalmente de la diana sobre la que actúan los fármacos que actualmente están disponibles en el mercado para el tratamiento de las infecciones por HSV-1, como los mencionados previamente: aciclovir, famciclovir y valaciclovir.

- 5 Se demuestra en los ejemplos de la presente memoria que este nanoanticuerpo posee una actividad antiviral *in vitro* frente al HSV-1, **neutralizando la infección de cultivos de células Vero a concentraciones similares a las del aciclovir**, compuesto de referencia y usado como control, presentando mecanismos de acción diferentes como ya se ha señalado.
- 10 Además, el nanoanticuerpo es **selectivo**, tal y como se comprueba en los ensayos de inmunofluorescencia realizados, donde se observa que este nanoanticuerpo marca las proteínas expresadas en la superficie de las células Vero al ser infectadas por el HSV-1, mientras que las células que no están infectadas no presentan fluorescencia, lo que da muestra de su **especificidad**. Por tanto, **puede ser utilizado para el diagnóstico de**  
15 **infecciones por HSV-1.**

Un aspecto importante es que el nanoanticuerpo **no es tóxico** para células del hospedador, lo que lo posiciona como un excelente candidato a ser utilizado en un método seguro de **tratamiento para el HSV-1.**

La presente memoria también describe el **procedimiento para la obtención** de dicho  
20 nanoanticuerpo.

**El nanoanticuerpo NbHSV69B**, en adelante “nanoanticuerpo de la invención”, en el contexto de la presente invención, se define como la proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, siendo SEQ ID NO: 2:

MAQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASIDNFRGYSVGWFRQAPGKEREWVSGIEAGYEW  
25 PYYADSVKGRFTLSRDNVKNVVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAGITYGAYNYWGQGTQVTVSS  
AAAYPYDVPDYGSHHHHHH.

El nanoanticuerpo NbHSV69B también está definido por la molécula de ácido nucleico que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ. ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

30 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID. NO: 2,

- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- 5 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ. ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales del nanoanticuerpo NbHSV69B.

Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia aquí 10 nombrada como la SEQ. ID NO: 1:

ATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCT  
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTATAGACAACCTTCAGAGGGTATTGGTGGCTGGTT  
CCGCCAGGCTCCAGGAAGGAACGTGAGTGGGTGTCAGGTATTGAGGCTGGTTATGAA  
TGGCCAGTTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCCCTCTCCGAGACAAACGTCA  
15 AGAACGTGGTGTACCTACAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTAC  
TGTGCGGCCGGCATAACATACGGCGCGTATAATTATTGGGCCAGGGGACCCAGGTCA  
CCGTCTCCTCAGCGGCCGCATACCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCCACCACCA  
TCACCATCAC

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, 20 refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN) como desoxirribonucleótidos (ADN).

Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o 25 bioquímicamente modificados.

Por tanto, **un primer aspecto** de la invención se refiere al nanoanticuerpo aislado NbHSV69B de secuencia aminoacídica SEQ. ID NO: 2, o proteína aislada con una identidad de al menos:

- a) Un 90% con la SEQ. ID NO: 2,  
30 b) Un 95% con la SEQ. ID NO: 2,

c) Un 99% con la SEQ. ID NO: 2,

y que posee la actividad y las características estructurales del nanoanticuerpo NbHSV69B o, nanoanticuerpo de la invención.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere al ácido nucleico aislado de secuencia 5 aminoacídica SEQ ID NO: 1 que codifica el nanoanticuerpo NbHSV69B.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico aislado de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 que codifica el nanoanticuerpo NbHSV69B

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a una célula huésped que comprende el ácido 10 nucleico de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 o el vector que lo comprende.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende el nanoanticuerpo de la invención, el ácido nucleico de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, el vector que comprende dicho ácido nucleico o la célula huésped anteriormente referida, en adelante “composición de la invención”. Preferiblemente, la composición de la invención es 15 una composición farmacéutica. Más preferiblemente, además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida de la composición de la invención, esta además comprende otro principio activo.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere al nanoanticuerpo de la invención, el ácido 20 nucleico de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 el vector que comprende dicho ácido nucleico, la célula huésped anteriormente referida o la composición de la invención en cualquiera de sus realizaciones para su uso para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la infección causada por el HSV, preferiblemente de tipo 1.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere al nanoanticuerpo de la invención para su 25 uso en un método de diagnóstico de la infección por el virus del HSV-1.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere al método de diagnóstico de la infección por HSV-1 que se lleva a cabo sobre una muestra de tejido previamente aislada que presenta lesiones compatibles con la infección causada por el virus HSV-1 y que comprende:

a) infectar con dicha muestra aislada un cultivo celular, preferiblemente de células Vero

- b) incubar cultivo celular infectado, preferiblemente las células Vero, junto con el nanoanticuerpo de la invención,
- c) llevar a cabo una prueba que permita detectar el nanoanticuerpo de la invención unido a las células del cultivo celular, en su caso de células Vero, preferiblemente mediante 5 inmunofluorescencia.

Preferentemente la prueba de inmunofluorescencia se lleva a cabo tal y como se describe más adelante en el ejemplo 5. La presencia de fluorescencia en el cultivo de células Vero es indicativa de infección por el virus HSV-1, cualquiera que sea el nivel de fluorescencia.

Un **noveno aspecto de la invención** se refiere a un kit de diagnóstico que comprende 10 nanoanticuerpo de la invención y medios para detectar la unión específica del nanoanticuerpo con el virus HSV-1.

Un **último aspecto** de la invención describe el procedimiento de obtención del nanoanticuerpo de la invención, que comprende:

- a. aislar ARNm de células mononucleares de sangre periférica extraídas de camélidos 15 previamente inmunizados con virus HSV-1 inactivo,
- b. retrotranscribir el ARN a ADNc,
- c. amplificar las secuencias VHH o nanoanticuerpos de camélido por PCR,
- d. clonar y amplificar en *Escherichia coli* los nanoanticuerpos ligados en un vector fagémido,
- e. aislar las partículas fágicas obtenidas,
- f. exponer las partículas fágicas al HSV-1,
- g. seleccionar las partículas fágicas unidas de forma específica frente al virus HSV-1
- h. amplificar las partículas fágicas seleccionadas en *E. coli*, y
- i. seleccionar los nanoanticuerpos con alta afinidad de unión.

25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se

desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** Eficiencia de inmunización con el antígeno HSV-1 inactivo (**A**) Tabla de la ratio de Ag+/Ag- de los valores de absorbancia de la prueba de ELISA. Muestra valores de diluciones seriadas ½ del suero de camello antes de inmunizar (Suero Pre) y de diluciones seriadas ½ del suero de camello después de la inmunización (Suero Post). (**B**) Gráfica de los valores de la tabla anterior. Una ratio de Ag+/Ag- superior a 2,5 indica buena inmunización y presencia de nanoanticuerpos específicos.

**Figura 2:** Datos de los Biopanning realizados y la selección de candidatos de las diferentes rondas; del Biopanning 1 se seleccionaron 190 candidatos (95 A y 95 B) y del Biopanning 2 95 (C).

15 **Figura 3:** Cálculo de la dosis viral que infecta al 50% de las células (TCID50): el porcentaje de viabilidad celular de células Vero a cada dilución del virus HSV-1. La línea denominada 50 marca el 50% de viabilidad celular. La línea de tendencia marca el punto de corte entre el 50% de viabilidad celular y la dilución o dosis de HSV-1 necesaria. Valores medios con su desviación estándar.

20 **Figura 4:** Ensayos de neutralización de 100TCID50 de HSV-1 en células Vero. Porcentaje de viabilidad celular de los diferentes ensayos realizados, con distintas concentraciones del nanoanticuerpo de la invención NbHSV69B, y del aciclovir, utilizado como control positivo. La línea denominada 50 marca el 50% de la viabilidad celular del control de células sin infectar ni tratar, además de la concentración mínima neutralizante de aciclovir o del 25 nanoanticuerpo de la invención usando 100TCID50 de HSV-1. Valores medios con su desviación estándar.

**Figura 5:** Ensayo de citotoxicidad en células Vero sin infectar. Viabilidad celular en concentraciones decrecientes de aciclovir (verde), DMSO (amarillo) como control del disolvente del aciclovir y del nanoanticuerpo NbHSV69B de la invención (azul). Valores 30 medios con su desviación estándar.

**Figura 6:** Ensayo de inmunofluorescencia. Imágenes obtenidas por microscopio de fluorescencia. (A) Célula Vero infectada por HSV-1 en presencia del nanoanticuerpo NbHSV69B más anticuerpos primario anti-hemaglutinina (HA) (Biolegend, purified anti HA.11 Epitope Tag Antibody) y secundario anti-ratón conjugado con Alexa 488 (A11001, Life Technologies), detectando las proteínas de superficie del virus en la membrana celular (en color verde). En color azul los núcleos celulares teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). (B) Células Vero infectadas por HSV-1 sin NbHSV69B con anticuerpos primario y secundario (C) Célula Vero no infectada por HSV-1 en presencia del nanoanticuerpo NbHSV69B más anticuerpos primario y secundario. (D) Células Vero no infectadas por HSV-1 sin NbHSV69B con anticuerpos primario y secundario.

**Figura 7:** Análisis de los datos generados con la inmunoprecipitación. (A) Tabla del diagrama de Venn donde se interrelacionan todas las proteínas detectadas en cada réplica realizada de inmunoprecipitación del HSV-1 con el nanoanticuerpo de la invención. (B) Figura del diagrama de Venn de la tabla A.

15 **Figura 8:** Mapa del fágido pMES4 y puntos de referencia de las secuencias (GenBank: GQ907248.1). promotor Lac UV5: bases 143-198; RBS (sitio de unión al ribosoma): bases 211-215; pelB (péptido señal): bases 225-290; Sitio de clonación múltiple (Pst I, Xba I, Bst EII): bases 305-325; His-tag (seis histidinas en tandem): bases 340-357; etiqueta HA (hemaglutinina): bases 361-385; gen III del bacteriófago M13: bases 391-1623; resistencia a 20 ampicilina: bases 2701-3558.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Cultivo de células y virus empleados para los ensayos.

Las células Vero (células de riñón de mono verde africano) se mantuvieron en medio DMEN 25 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose (Biowest, L0103), adicionado del 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) inactivado por calor (Sigma Aldrich, 10270106), 100U/ml de Penicilina, 100ug/ml de Estreptomicina (Sigma Aldrich, P0781) y 1% de L-Glutamina (Sigma Aldrich, G8540) en ambiente humidificado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

El virus HSV-1 se adquirió en dos formatos: el virus inactivo (Ref: 229-20255, RayBiotech) y 30 el virus activo VR-1493™ de American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA, que se propagaron en células Vero en laboratorio con un nivel de bioseguridad 2.

**Ejemplo 1: Generación, expresión y purificación del nanoanticuerpo de la invención.**

Inmunización y aislamiento de los linfocitos.

Se inmunió un camello con 0,6mg totales del HSV-1 inactivo (229-20255) (RayBiotech) como antígeno, inoculando 0,1mg por semana durante seis semanas.

- 5 Se recogió una muestra de suero antes de comenzar la inmunización para comprobar la respuesta inmune frente al antígeno.

La sangre periférica recogida después de la inmunización se diluyó de forma seriada v en PBS estéril y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PMBC).

Para comprobar la eficiencia de la inmunización y continuar con la generación de la 10 biblioteca de nanoanticuerpos, se realizó un test ELISA de anticuerpos con los sueros recolectados antes (pre) y después (post) de inmunizar.

En placas de fondo plano y 96 pocillos Nunc-Immuno™ MicroWell™ (Sigma Aldrich, M5785), se inmovilizaron siete pocillos de dos filas separadas con el antígeno HSV-1 (229-20255, RayBiotech) incubando a 4°C durante toda la noche, dejando la fila de debajo de 15 cada una para el control negativo del suero pre y post inmunización.

Al día siguiente, se realizan diluciones seriadas ½ de los sueros pre y post en leche al 2% en una placa de 96 pocillos de microtitulación (Deltalab, 900011). Se añadieron las diluciones seriadas de suero pre y post inmunización a la placa de ELISA como anticuerpo primario con el antígeno inmovilizado y prelavado con PBST (tampón fosfato salino con una 20 baja concentración de solución detergente). Tras una hora de incubación se añadió como anticuerpo secundario un anticuerpo anti llama (Thermo Fisher, A16060) conjugado con peroxidasa (HRP) en las mismas condiciones que el anticuerpo anterior. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, se volvió a lavar la placa con PBST. Para revelar el experimento, se adicionó ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina- solución de sustrato de 25 6-sulfonato) /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de HRP (Roche ABTS tablets, REF 11112422001) (100 µl/pocillo) y se realizó la lectura a 405 nm en un espectrofotómetro (Infinite M200PRO).

La ratio Antígeno positivo / Sin antígeno (Ag+/Ag-) de los valores de absorbancia del test ELISA post inmunización, superiores a 2,5 [4], muestran una buena inmunización y presencia de nanoanticuerpos específicos (**Figura 1A y 1B**).

Generación de una biblioteca de nanoanticuerpos en fagos

Para la construcción de la biblioteca de nanoanticuerpos frente a HSV-1 se siguió el protocolo que se describe a continuación [5].

- Extracción de ARNm y retrotranscripción; el ARNm total extraído de las PBMC se retrotranscribió a ADNc utilizando RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo) y 5 cebadores de Oligo (dT)<sub>1</sub>. Los parámetros para la retrotranscripción fueron: 1 ciclo a 42°C durante 60 minutos y 1 ciclo a 70°C durante 20 minutos.
- Amplificación de las secuencias VHH; A partir del ADNc purificado, se amplificaron los fragmentos de genes que codifican las regiones variables de las cadenas pesadas de todas las inmunoglobulinas de camélidos. Los oligonucleótidos utilizados fueron; CALL001: 5'-  
10 GTCCTGGCTGCTCTACAAGG-3' (SEQ. ID. NO: 3) y CALL002: 5'-  
GGTACGTGCTGTTGAAGTGTCC-3' (SEQ. ID. NO: 4). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con la ADN polimerasa Hot Start Taq (5 U/ml, Roche) y los parámetros de PCR fueron: 95°C, 15 minutos para activar a la polimerasa y posteriormente, 32 ciclos a (94°C, 1 minuto; 55°C, 1 minuto; 72°C, 1 minuto) y finalmente un paso de  
15 extensión de 72°C, 10 minutos. El producto de PCR se purificó y utilizó como molde en una segunda PCR. Para amplificar las secuencias VHH se utilizaron los oligonucleótidos anidados: A6E: 5'-GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG-3' (SEQ. ID. NO: 5) y 38: 5'-GGACTAGTGCAGCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT-3' (SEQ. ID. NO: 6) que contienen las secuencias diana de las enzimas PstI y BstEII en sus extremos para la  
20 posterior clonación de los insertos. Los parámetros de amplificación fueron: 95°C, 15 minutos, 18 ciclos (94°C, 45 segundos; 55°C, 45 segundos; 72°C, 45 segundos) y 72°C, 10 minutos.
- Clonación del repertorio de nanoanticuerpos en un vector fagémido; se llevó a cabo la digestión del repertorio de fragmentos de VHH amplificados y del fagémido pMES4  
25 (GenBank: GQ907248.1) (**Figura 8**) para su posterior ligación durante toda la noche con ADN ligasa T4 que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el fosfato del extremo 5 y el hidroxilo del extremo 3 yuxtapuestos para la unión de las dos moléculas deseadas de ADN (inserto y vector) en un plásmido.

El producto de la ligación se transformó en células de la cepa de *E. coli* TG1 competentes 30 (Biosearch Technologies), las cuales se infectaron con el fago auxiliar VCSM13 (Agilent) y se incubaron en el medio selectivo Luria Bertani (LB) con los antibióticos Ampicilina (Sigma Aldrich) y Kanamicina (Sigma Aldrich) para disponer la biblioteca en partículas fágicas. Tras

la incubación, se aislaron las partículas fágicas precipitando mediante centrifugación con Polientilenglicol 6000 (Sigma Aldrich).

Enriquecimiento de clones específicos frente al HSV-1: Rondas de selección o Biopanning

Un pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos para ELISA se recubrió con una cantidad determinada de antígeno HSV-1. Después de incubar durante un tiempo, se bloqueó con leche en polvo al 2% en tampón fosfato salino (PBS 1X: NaCl 137 mM (Scharlau), KCl 2,7 mM (Sigma Aldrich), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (Sigma Aldrich) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM (Sigma Aldrich)) durante 2 horas a temperatura ambiente.

A continuación, se agregaron 10<sup>11</sup> partículas fágicas y se incubaron para permitir la unión específica. Las partículas fágicas específicas de antígeno se eluyeron con trietilamina (TEA) 100 mM (pH 11,0), se transfirieron a un tubo estéril y se neutralizaron con 100 µl de Tris-HCl 1,0 M (pH 7,4).

El mismo procedimiento se realizó simultáneamente en un pocillo sin antígeno para determinar el número de partículas fágicas unidas de forma inespecífica.

15 Las partículas fágicas eluidas del pocillo con antígeno (Ag+) se identificaron como partículas fágicas de la primera ronda de cribado.

Estas se amplificaron infectando células *E. coli* TG1 en fase exponencial en presencia de glucosa para repetir el mismo proceso en rondas sucesivas de cribado hasta que se determinó un enriquecimiento significativo mayor a 300 del pocillo con antígeno al de sin 20 antígeno.

Se realizaron dos Biopanning con tres rondas de enriquecimiento en cada uno. De la tercera ronda, con un enriquecimiento mayor a 300, del primer Biopanning, se seleccionaron 190 candidatos (95A y 95B) e, igualmente, del segundo Biopanning se seleccionaron otros 95 candidatos (C), obteniendo un total de 285 candidatos que se almacenaron a -80°C en 25 placas de 96 pocillos estériles en medio de cultivo (**Figura 2**).

Selección de clones específicos frente al HSV-1.

En placas de fondo plano y 96 pocillos Nunc-Immuno™ MicroWell™ (Sigma Aldrich, M5785) se recubrieron todos los pocillos de una fila con el antígeno HSV-1 (229-20255, RayBiotech) dejando la fila de debajo para el control negativo de cada candidato sin antígeno.

Por otro lado, en placas de almacenamiento de 2,2 ml (Thermo Fisher, AB0932), se crecieron los 285 candidatos en medio 2XTY/ampicilina 100 µg/ml/ 1% glucosa a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de ≈1 y se indujeron con 1 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG). Posteriormente se centrifugó a 3000g durante 20 minutos y 5 se resuspendieron en PBS para añadir cada candidato en la placa de ELISA en una posición con antígeno (Ag+) y sin antígeno (Ag-).

La detección de nanoanticuerpos específicos se realizó con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-hemaglutinina (HA) (Biolegend, purified anti HA.11 Epitope Tag Antibody) en 2% de leche en polvo en PBS incubado durante 1 hora. Se lavó con PBST (tampón fosfato 10 salino con una baja concentración de solución detergente) y se añadió anticuerpo secundario anti- inmunoglobulina G de ratón conjugado con peroxidasa (HRP) (Promega, W402B) en las mismas condiciones que el anticuerpo anterior.

Para revelar el experimento, se adicionó ABTS (2,2'-azino-di-(3-etylbenzotiazolina- solución de sustrato de 6-sulfonato) /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de HRP (Roche ABTS tablets, REF 11112422001) (100 15 µl/pocillo) y se realizó la lectura a 405 nm en un espectrofotómetro (Infinite M200PRO). Se consideraron como positivos todos los candidatos con una ratio Ag+/Ag- mayor o igual a 2,5 [4]. Se descartaron 13 que no cumplían esta condición, quedando 272 candidatos.

#### Secuenciación y caracterización de VHVs.

Los 272 nanoanticuerpos con mayor afinidad se secuenciaron por el método Sanger usando 20 el oligonucleótido MP57: TTATGCTTCCGGCTCGTATG (SEQ. ID. NO: 7), específico del fagérido, como cebador.

Se hizo una traducción de todas las secuencias de ADN a proteínas para posteriormente ser alineadas y organizadas en función del porcentaje de similitud. De todas las secuencias se obtuvieron 8 grupos con diferente secuencia de aminoácidos, se seleccionó un 25 nanoanticuerpo de cada grupo al azar y se determinó cuáles eran VH y cuales VHH siguiendo el criterio anteriormente descrito de la Numeración del Sistema de información ImMunoGeneTics-IMGT <http://www.imgt.org> correspondiente a las posiciones 37, 44, 45 y 47 en numeración Kabat, <http://www.kabatdatabase.com>)

#### Expresión y purificación de nanoanticuerpos en *E. coli*.

30 La expresión y purificación de los 8 nanoanticuerpos de secuencia distinta que se obtuvieron, se realizó siguiendo el protocolo [6] que emplea la cepa de *E. coli* WK6.

En 1 litro de medio TB/ampicilina/glucosa se adicionaron 3 ml del precultivo de nanoanticuerpo en células WK6 crecido la noche anterior. Se incubó a 37°C en agitación hasta que la DO a 600 nm alcanzó la fase exponencial ~ 0,8. Después, se añadió isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) (Thermo Scientific™) 1 mM para inducir la expresión de los nanoanticuerpos. Posteriormente, se centrifugó a 4°C durante 8 minutos a 9000g. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en tampón TES (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NNaO<sub>6</sub>S) y se incubó a 4°C durante 3 horas. Posteriormente, se agregó 24 ml de TES/4 (dilución ¼ del tampón TES) y se incubaron durante toda la noche a 4°C en un agitador horizontal. Se añadió MgCl<sub>2</sub> 10 mM y se centrifugó a 9000g y una temperatura de 4°C durante 30 minutos.

10 El sobrenadante, que contenía los nanocuerpos, se equilibró con el tampón de unión (20 mM tampón fosfato, 0.5 M NaCl, 30 mM imidazol pH 7,4) y se purificó mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) usando el sistema de purificación de proteínas ÄKTA™ (GE Healthcare Life Sciences), [7] con las columnas His-Trap™ HP de 1 ml. La concentración de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford.

### 15 Ejemplo 2: Determinación de la TCID50 del HSV-1

Se realizó un ensayo con el fin de conocer la cantidad de partículas infecciosas de HSV-1 necesaria para llegar a una infección del 50% del cultivo (TCID50) siguiendo el método de Spearman-Karber como se describió anteriormente por [8, 9]. Brevemente, se sembraron 10<sup>4</sup> células Vero/pocillo en placas de 96 pocillos menos la columna 12 y se incubaron 20 durante 24 horas. Se realizaron diluciones seriadas (10<sup>-1</sup> –10<sup>-7</sup>) del stock de virus en Minimun Essential Medium (MEM) (Biowest, L0430), con un 2% de Suero Fetal Bovino inactivo (Sigma Aldrich, 10270106) y 50U de Penicilina, 50 µg de Estreptomicina (Sigma Aldrich, P0781) y se agregaron 100 µl de cada dilución a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Además, se pusieron pocillos con células sin infectar como control celular (CC) en 25 la columna 11 y la columna 12 como control del revelador. Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 días.

Se determinó la viabilidad celular mediante la tinción con el revelador Neutral Red (Sigma Aldrich, N4638) siguiendo el protocolo [9] usando como fijador la acetona (Scharlau, AC03141000) al 80% en DPBS (Sigma Aldrich, D8537).

30 El título TCID50 del virus fue de 4,22x10<sup>5</sup>/ml y se calculó según el método de Spearman-Karber [8] tal y como se muestra en la **Figura 3**.

**Ejemplo 3: Ensayo de neutralización viral.**

Las células Vero se sembraron en placas de 96 pocillos a  $10^4$  células/pocillo, dejando la columna 12 vacía y se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El nanoanticuerpo de la invención **NbHSV69B** y el aciclovir (Sigma Aldrich, PHR1254), como control positivo de neutralización, se diluyeron en Minimun Essential Medium (MEM) 5 (Biowest, L0430), 2% de Suero Fetal Bovino inactivo por calor (Sigma Aldrich, 10270106) y 100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomicina (Sigma Aldrich, P0781) a una concentración inicial de 40 µM haciendo diluciones seriadas ½ en un volumen final de 50 µl. En la columna 9 se usaron ocho pocillos como control de infección de virus (100TCID50/pocillo) en 100 µl. En la columna 10 se realizó un control de titulación de virus 10 haciendo diluciones seriadas 1/10 de los virus previamente titulados en 100 µl. En la columna 11 se usaron ocho pocillos para CC en 100 µl. Las diluciones del nanoanticuerpo y del aciclovir, se mezclaron con un volumen igual de virus HSV-1 (50 µl) diluidos para producir 100TCID50/pocillo y se incubaron durante 1 hora en ambiente humidificado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, a las células presembradas y lavadas con DPBS 15 (Sigma Aldrich, D8537), se le transfirió las mezclas de virus y nanoanticuerpo o de virus y aciclovir. Se incubaron durante 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Se determinó la viabilidad celular mediante la tinción con Neutral Red (Sigma Aldrich, N4638) siguiendo el mismo protocolo descrito en la determinación de la TCID50. Se definieron como neutralizantes aquellos pocillos en los que había una viabilidad igual o 20 mayor al 50% de la media del control de células. En la **Figura 4** se muestran los resultados del ensayo. La línea 50 marca el 50% de la viabilidad celular calculada con el CC. Por encima de esta línea la viabilidad celular es elevada y por tanto la infección de las células por el virus es pequeña.

En este ensayo se determinó que el nanoanticuerpo de la invención (**NbHSV69B**) es **capaz 25 de neutralizar la infección de las células por el HSV-1, mostrando unas concentraciones que se asemejan a los del aciclovir**, tratamiento de elección utilizado actualmente, como se puede observar en la siguiente Tabla 1, donde se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos.

**Tabla 1:** Comparativa entre los resultados de viabilidad celular de células infectadas con 30 HSV-1 y sometidas a tratamiento con nanoanticuerpo de la invención (VHH69B) y aciclovir a diversas concentraciones. Los P valores obtenidos con un t Test paramétrico realizado en GraphPad Prism versión 9. Se consideran diferencias significativas valores p <0,01.

| <b>Concentración [uM]</b> | <b>P valor</b> |
|---------------------------|----------------|
| 0,3125                    | 0,044715       |
| 0,625                     | 0,305218       |
| 1,25                      | 0,282638       |
| 2,5                       | 0,511385       |
| 5                         | 0,058925       |
| 10                        | 0,249396       |
| 20                        | 0,904198       |
| 40                        | 0,179873       |

#### Ejemplo 4: Ensayo citotoxicidad.

Se realizó un ensayo de citotoxicidad a distintas concentraciones del nanoanticuerpo de la invención NbHSV69B, aciclovir y del vehículo o disolvente de este último (DMSO), en células Vero. Las células Vero se sembraron en placas de 96 pocillos a  $10^4$  células/pocillo, dejando la columna 12 vacía y se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El nanoanticuerpo de la invención NbHSV69B, el aciclovir (Sigma Aldrich, PHR1254) y el DMSO (Sigma Aldrich, D8418), se diluyeron en Minimun Essential Medium (MEM) (Biowest, L0430), adicionado de un 2% de Suero Fetal Bovino inactivado por calor (Sigma Aldrich, 10270106) y 100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomicina (Sigma Aldrich, P0781) a una concentración inicial de 75 µM haciendo diluciones seriadas ½ en un volumen final de 50 µl. A las células presembradas y lavadas con DPBS (Sigma Aldrich, D8537), se les transfirieron las diluciones de nanoanticuerpo, aciclovir y DMSO. Se incubaron durante 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y se determinó la viabilidad celular mediante la tinción con Neutral Red (Sigma Aldrich, N4638) siguiendo el protocolo [9] usando como fijador la acetona (Scharlau, AC03141000) al 80% en DPBS (Sigma Aldrich, D8537).

Los resultados del ensayo de citotoxicidad confirmaron que el nanoanticuerpo NbHSV69B no disminuyó la viabilidad celular de forma significativa a ninguna concentración, siendo esta aún mayor a las concentraciones usadas en el ensayo de neutralización y que son efectivas frente a la neutralización de infección (**Figura 5**).

A diferencia de lo que ocurre con el aciclovir, a concentraciones mayores de 40 µM, el nanoanticuerpo NbHSV69B **no es tóxico para las células**. El aciclovir disminuye la viabilidad celular por debajo del 80% a concentraciones mayores de 40 µM, quedando excluido de este efecto el dimetilsulfóxido (DMSO) como su disolvente y vehículo.

**Ejemplo 5: Inmunofluorescencia.**

Las células Vero se sembraron en cubreobjetos circulares de 13 mm colocados en placas de 24 pocillos y se incubaron durante la noche para que se adhirieran. Se infectaron las células con 0,5 ml de la dilución que en un ensayo previo había generado un 50% de viabilidad celular y que se comprobó y confirmó dicha viabilidad por observación de los cultivos al microscopio. Dicha dilución se correspondía a las diluciones  $10^{-3}$  del mismo lote de virus amplificados y titulados para los ensayos de neutralización. Al control de células no infectadas, se le añadió 0,5 ml de medio sin virus. Se incubaron durante 24 horas en ambiente humidificado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas las 24 horas post-infección se retiró el medio y se lavaron las células 3 veces con DPBS para después fijarlas con PFA al 4% (v/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el fijador, se lavó 3 veces con DPBS y se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA) al 10% (A7906, Sigma Aldrich) durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Tras la incubación de células infectadas y no infectadas, se lavó con DPBS y se incubaron ambas con el nanoanticuerpo de la invención NbHSV69B. A cada pocillo se le añadieron 200 µl/pocillo y una cantidad final de nanoanticuerpo de 2,64 µg. Se incubó a 4°C durante toda la noche (ON). Los pocillos a los que no se les añadió nanoanticuerpo se incubaron con 200 µl de tampón de dilución. Tras la incubación se realizaron 3 lavados.

Como anticuerpo primario se usó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-hemaglutinina (HA) (Biolegend, purified anti HA.11 Epitope Tag Antibody) a una dilución 1/500 en tampón de dilución. Se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y tras lavar, se incubó con el anticuerpo secundario (anti-ratón conjugado con Alexa 488) (A11001, Life Technologies) a una dilución 1/500 en tampón de dilución durante 30 minutos a 4°C en oscuridad.

Las condiciones de ensayo fueron las siguientes: células infectadas más NbHSV69B más anticuerpos primario y secundario, células infectadas sin NbHSV69B con anticuerpos primario y secundario, y estas dos mismas condiciones con células no infectadas.

Finalmente, todos los cubreobjetos se montaron en portaobjetos (J2800AMNZ, Thermo Fisher Scientific) con Vectashield (H-1200, Vector), incluido DAPI para contratinación nuclear.

Las imágenes se tomaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager A.1 con un objetivo de inmersión de 63x. Las imágenes (**Figura 6**) fueron capturadas desde campos de visión seleccionados al azar.

Se observa que el nanoanticuerpo NbHSV69B marca las proteínas expresadas en la superficie de las células Vero al ser infectadas por el HSV-1, mientras que las células que no están infectadas no presentan fluorescencia, lo que da muestra de su **especificidad**.

#### Ejemplo 6: Inmunoprecipitación.

- 5 Para la inmunoprecipitación, se solubilizaron 500 µg de HSV-1 inactivo (229-20255, RayBiotech) con buffer RIPA a una proporción 1:1. Los virus se incubaron durante 10 minutos en hielo y después fueron vorteados durante 30 segundos. La solución se mezcló con el nanoanticuerpo NbHSV69B a una concentración de 2 µg/100 µl y se incubó durante toda la noche a 4°C.
- 10 A continuación, se añadieron 7 µg de anticuerpo anti-hemaglutinina (HA) (Biolegend, purified anti HA.11 Epitope Tag Antibody) y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas, seguidas por una incubación adicional de 2 horas con bolitas magnéticas Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads (Thermo Scientific). Este procedimiento se realizó tres veces en tiempos diferentes obteniendo 4 réplicas distintas.
- 15 De igual manera se llevó a cabo la inmunoprecipitación del HSV-1 con diferentes anticuerpos para descartar las uniones inespecíficas. Estos anticuerpos fueron el anti-hemaglutinina (HA) (Biolegend, purified anti HA.11 Epitope Tag Antibody) específico del nanoanticuerpo, un anti IgG (12-370, Sigma Aldrich) y un nanoanticuerpo que reconoce específicamente a una proteína de membrana del protozoo parásito *Trypanosoma brucei*.
- 20 Las muestras se lavaron y eluyeron siguiendo las recomendaciones del fabricante. La identificación de las proteínas se realizó por cromatografía líquida-espectrometría de masas en el servicio de proteómica de la Universidad de Córdoba.

Con los controles negativos se han podido eliminar todas aquellas proteínas que se han detectado de forma inespecífica o como contaminantes. Seguidamente se procedió con el 25 análisis bioinformático mediante un diagrama de Venn que relacionó todas las proteínas detectadas en las cuatro réplicas realizadas.

Tras comprobar que solamente había tres proteínas que se repetían en las 4 réplicas (gB, ICP4 y MCP) se determinó que solo gB era una proteína de membrana del virus y además se encuentra en la membrana de células infectadas por el HSV-1, por lo que puede ser 30 detectada mediante Inmunofluorescencia como en el ensayo anterior. Las otras dos, ICP4 y MCP, están descritas como proteínas que en células infectadas por HSV-1 se encuentran en el núcleo o el citoplasma, no en la membrana plasmática, por lo que podrían ser uniones

inespecíficas del ensayo. La localización de las proteínas de interés se determinó con la base de datos de proteínas [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org). Esto evidenció que el nanoanticuerpo NbHSV69B de la invención se está uniendo a la gB de la envoltura del virus (**Figura 7**). Además, es la proteína que más veces se ha detectado y con un mayor porcentaje de 5 cobertura en péptidos de esta en todas las réplicas. Esta proteína está involucrada en el proceso de infección. La unión del nanoanticuerpo NbHSV69B y la gB justificaría los resultados que se han obtenido en los ensayos de neutralización del virus.

### Referencias

1. Cairns, Tina M., and Sarah A. Connolly. 2021. 'Entry of Alphaherpesviruses'. *Current Issues in Molecular Biology* 41:63–124. doi: 10.21775/cimb.041.063.
2. Karasneh GA, Shukla D. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success. *Virol J.* 2011 Oct 26;8:481. doi: 10.1186/1743-422X-8-481. PMID: 22029482; PMCID: PMC3223518.
3. Duggan S. Caplacizumab: First Global Approval. *Drugs.* 2018 Oct;78(15):1639-1642. doi: 10.1007/s40265-018-0989-0. Erratum in: *Drugs.* 2018 Dec;78(18):1955. PMID: 30298461; PMCID: PMC6280848.
4. Yan J, Li G, Hu Y, Ou W, Wan Y. Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *J Transl Med.* 2014 Dec 10;12:343. doi: 10.1186/s12967-014-0343-6.
- 20 5. Romão, Ema, Vianney Poignavent, Cécile Vincke, Christophe Ritzenthaler, Serge Muyldermans, and Baptiste Monsion. 2018. 'Construction of High-Quality Camel Immune Antibody Libraries'. Pp. 169–87 in *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1701. Humana Press Inc.
6. Vincke, Cécile, Carlos Gutiérrez, Ulrich Wernery, Nick Devoogdt, Gholamreza Hassanzadeh-Ghassabeh, and Serge Muyldermans. 2012. 'Generation of Single Domain Antibody Fragments Derived from Camelids and Generation of Manifold Constructs'. *Methods in Molecular Biology* 907:145–76. doi: 10.1007/978-1-61779-974-7\_8.
- 25 7. Gotesman M, Wang Y, Madasu SC, Mitchell CA. 2022. 'Purification of Cytoskeletal Proteins by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) Using an ÄKTA Start System'. Pp. 237–49 in *Cytoskeleton*.

8. Ramakrishnan, Muthannan Andavar. 2016. 'Determination of 50% Endpoint Titer Using a Simple Formula'. *World Journal of Virology* 5(2):85. doi: 10.5501/wjv.v5.i2.85.
9. Repetto, Guillermo, Ana del Peso, and Jorge L. Zurita. 2008. 'Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/ Cytotoxicity'. *Nature Protocols* 3(7):1125–31. doi: 10.1038/nprot.2008.75.

**REIVINDICACIONES**

1. Nanoanticuerpo aislado NBHSV69B de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, o proteína aislada con una identidad de al menos un 90%, o 95%, o 99% con SEQ ID NO: 2 y que posee la actividad y las características estructurales del nanoanticuerpo NBHSV69B.

5

2. Ácido nucleico aislado de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 que codifica el nanoanticuerpo NBHSV69B.

3. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación anterior.

10

4. Célula huésped que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 2 o el vector según la reivindicación 3.

5. Composición que comprende el nanoanticuerpo según la reivindicación 1, el ácido nucleico según la reivindicación 2, el vector según la reivindicación 3 o la célula huésped según la reivindicación 4.

6. La composición según la reivindicación anterior que es una composición farmacéutica.

20

7. La composición según la reivindicación anterior, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

8. La composición según la reivindicación anterior que además comprende otro principio activo.

9. El nanoanticuerpo según la reivindicación 1, el ácido nucleico según la reivindicación 2, el vector según la reivindicación 3 o la célula huésped según la reivindicación 4, o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para su uso para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la infección causada por el virus Herpes simple tipo 1.

10. El nanoanticuerpo según la reivindicación 1 para su uso en un método de diagnóstico de la infección por el virus Herpes simple tipo 1.

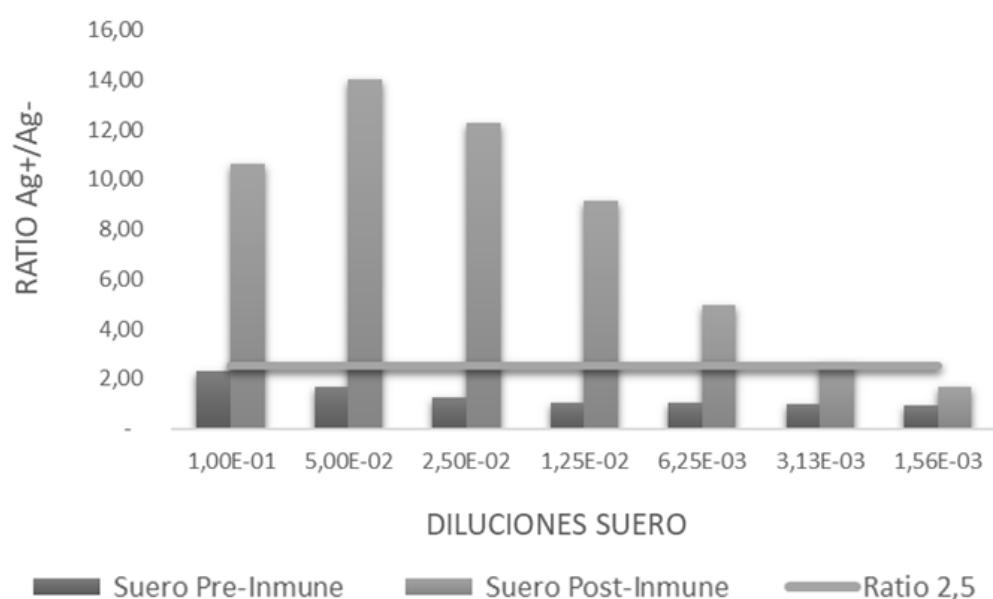
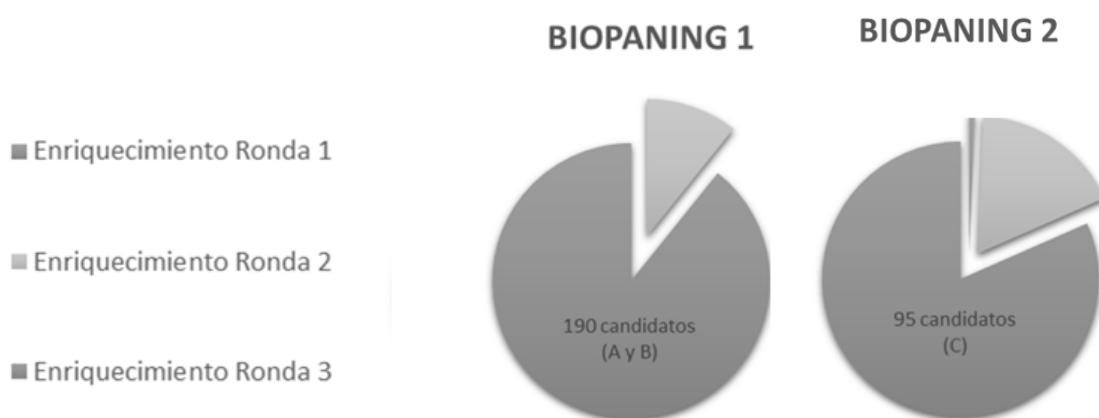
11. Método de diagnóstico de la infección por el virus Herpes simple de tipo 1 que se lleva a cabo sobre una muestra de tejido previamente aislada que presenta lesiones compatibles con la infección causada por el virus Herpes simple tipo 1 y que comprende:

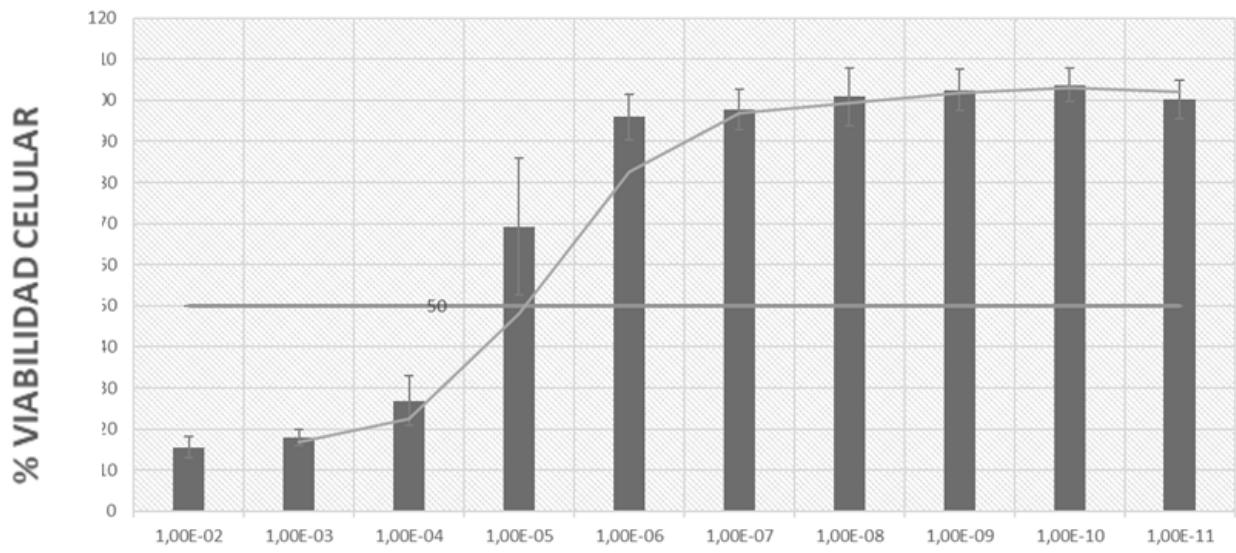
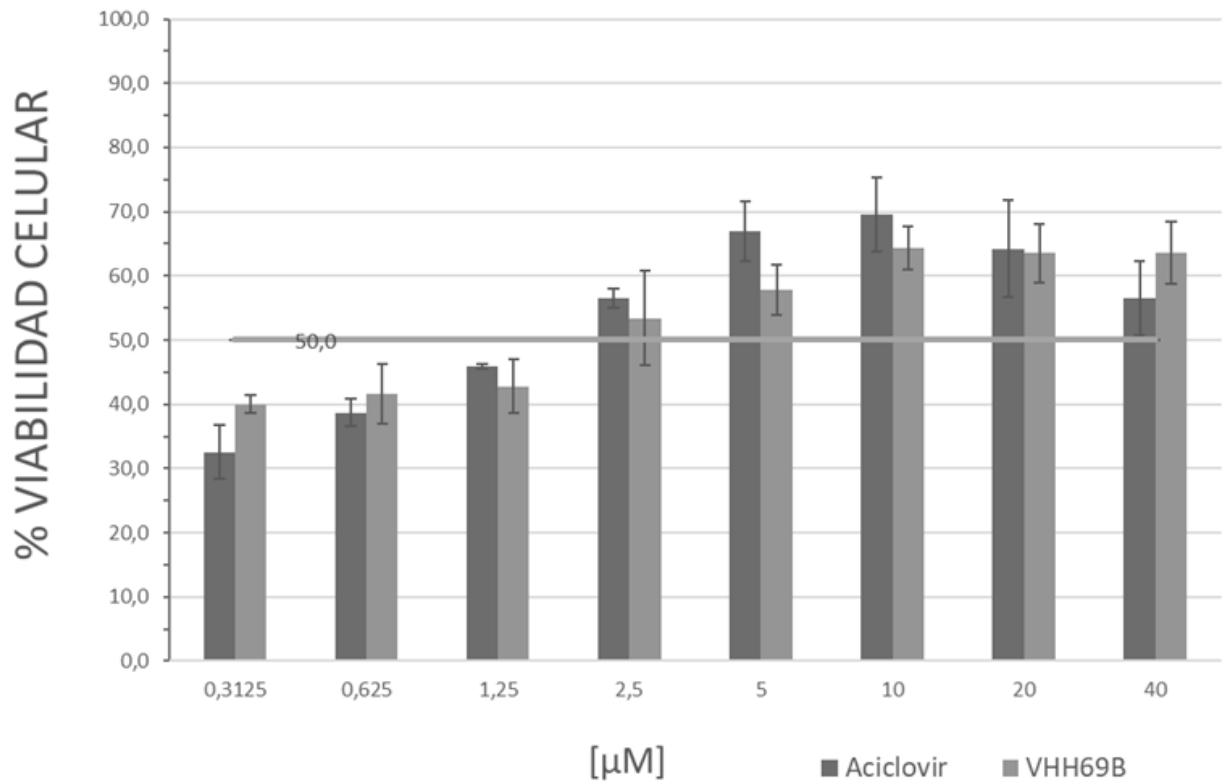
- 5 a) infectar con dicha muestra aislada un cultivo celular,
- b) incubar el cultivo celular infectado junto con el nanoanticuerpo según la reivindicación 1, y
- c) llevar a cabo una prueba que permita detectar el nanoanticuerpo según la reivindicación 1  
10 unido a las células del cultivo celular.

12. Kit de diagnóstico que comprende nanoanticuerpo según la reivindicación 1 y medios para detectar la unión específica del nanoanticuerpo con el virus Herpes simple tipo 1.

**A**

| Diluciones | 1,00E-01 | 5,00E-02 | 2,50E-02 | 1,25E-02 | 6,25E-03 | 3,13E-03 | 1,56E-03 |
|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Suero Pre  | 2,32     | 1,69     | 1,23     | 1,06     | 1,04     | 1,00     | 0,96     |
| Suero Post | 10,64    | 14,04    | 12,25    | 9,15     | 4,98     | 2,61     | 1,66     |

**B****FIG. 1****FIG. 2**

**FIG. 3****FIG. 4**

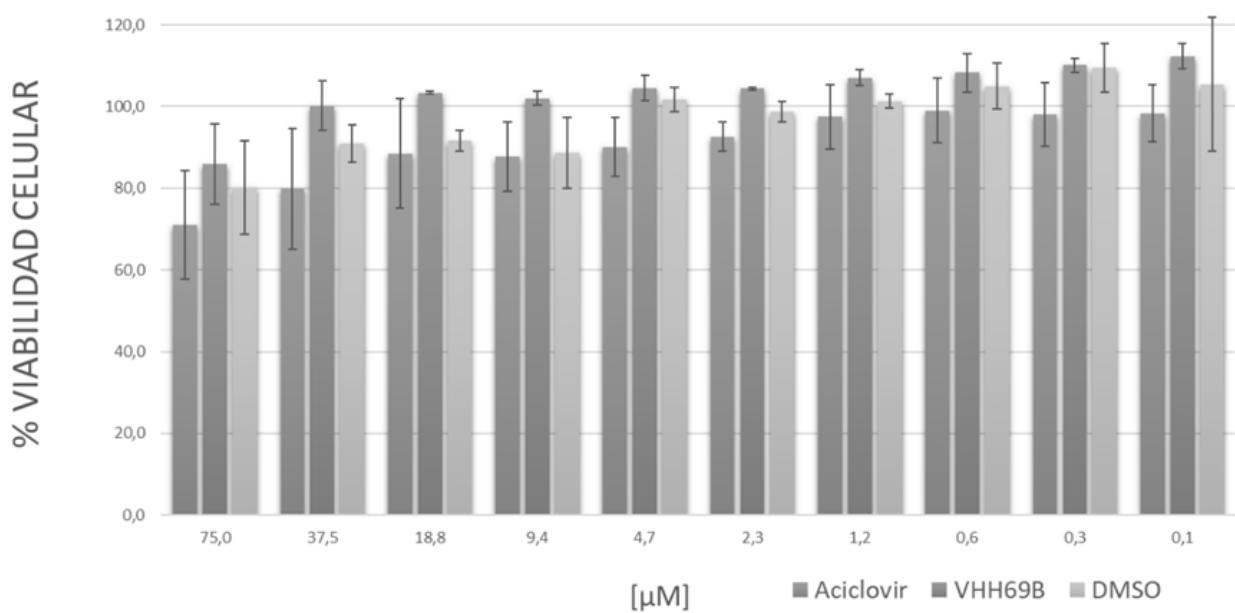


FIG. 5

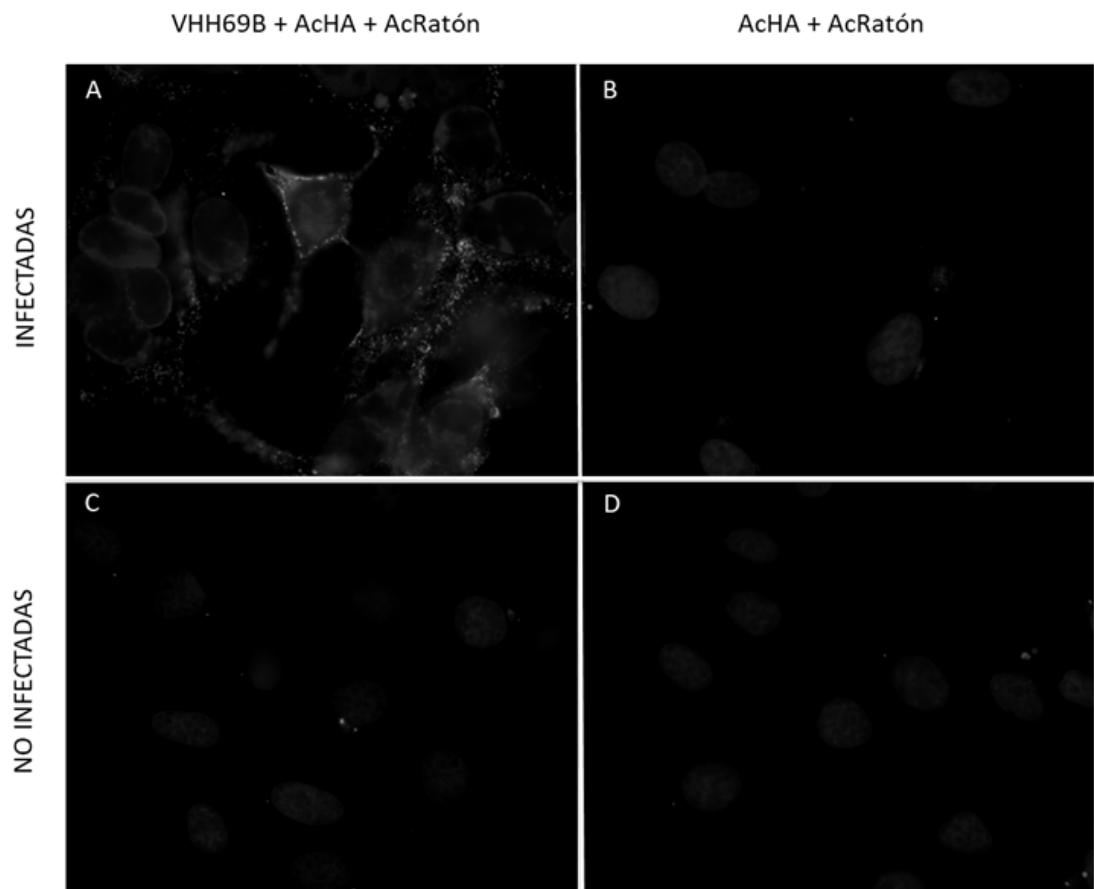
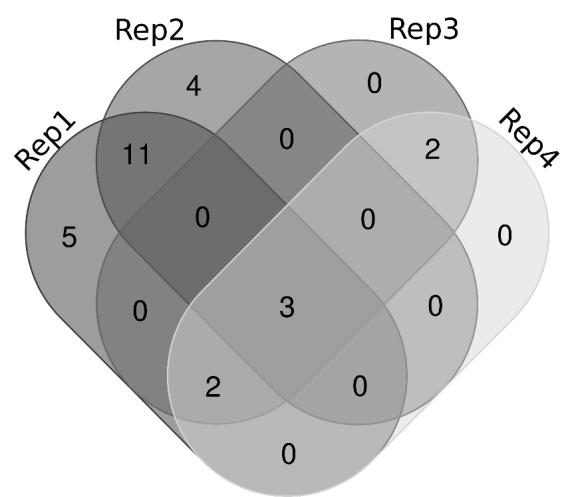


FIG. 6

**A**

| Replicas            | Nº Proteínas | Proteínas comunes   |
|---------------------|--------------|---|
| Rep1 Rep2 Rep3 Rep4 | 3            | gB<br>ICP4<br>MCP   |
| Rep1 Rep3 Rep4      | 2            | TRX1<br>ICP0  |
| Rep1 Rep2           | 11           | UL26<br>DBP<br>UL37<br>UL47<br>gE<br>UL12<br>TRX2<br>UL46<br>RIR1<br>UL36<br>UL48 |
| Rep3 Rep4           | 2            | US9<br>TEG4   |
| Rep1                | 5            | UL49<br>NEC1<br>UL42<br>NEC2<br>gH  |
| Rep2                | 4            | gC<br>gl<br>UL51<br>DUT   |

**B****FIG. 7**

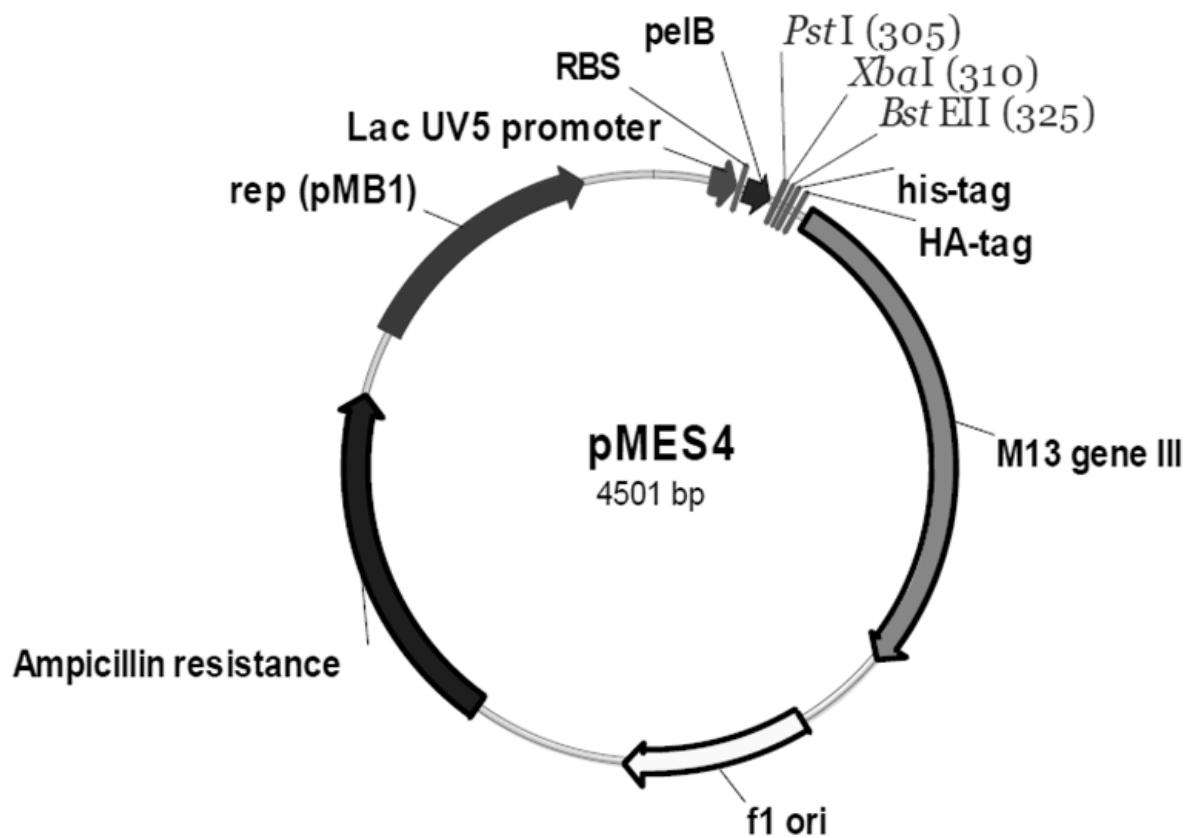


FIG. 8



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202330955

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 21.11.2023

(32) Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl. : **C07K16/08** (2006.01)  
**A61P31/22** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | 56   | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|--------------------|----------------------------|
| X         | BAGHERI, V. et al. "Neutralizing human recombinant antibodies against herpes simplex virus type 1 glycoproteins B from a phage-displayed scFv antibody library". Life Science, enero 2017, Vol. 169, Páginas 1 - 5 [en línea] [recuperado el 31/10/2024], ISSN 0024-3205, <DOI: doi: 10.1016/j.lfs.2016.11.018>. (ver punto 4.).   |                    | 1-12                       |
| A         | ASAADI, Y. et al. "A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments." Biomarker Research, diciembre 2021, Vol. 9, Nº 1, artículo nº 87 [en línea] [recuperado el 04/11/2024], ISSN 2050-7771 (Print), <DOI:10.1186/s40364-021-00332-6>. todo el documento.  |                    | 1-12                       |
| A         | NEJATOLLAHI, F. et al. "Neutralizing human single-chain antibodies against Herpes Simplex Virus type 1 glycoprotein D from a phage display library". International Journal of Microbiology and Immunology Research, mayo 2014, Vol. 2, Nº 3, Páginas 033-040 [en línea] [recuperado el 04/11/2024]. Recuperado de Internet <URL: http://academeresearchjournals.org/journal/ijmir>, ISSN 2327-7769. todo el documento. |                    | 1-12                       |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

|  |                                 |               |
|--|---------------------------------|---------------|
| Fecha de realización del informe<br>06.11.2024 | Examinador<br>M. d. García Coca | Página<br>1/2 |
|--|---------------------------------|---------------|

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

C07K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLP, EMBASE/Elsevier, EMBL-EBI, y Bases de Datos TXT