



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 847**

51 Int. Cl.:
C07K 14/05 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04708760 .6**
86 Fecha de presentación : **06.02.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1594890**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

54 Título: **Péptidos derivados del antígeno de la cápside de VCA-p18 del virus de Epstein-Barr y su uso.**

30 Prioridad: **21.02.2003 DE 103 07 517**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **Mikrogen Molekularbiologische
Entwicklungs-GmbH
Floriansbogen 2-4
82061 Neuried, DE**

72 Inventor/es: **Motz, Manfred;
Bauer, Georg y
Soutschek, Erwin**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 282 847 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados del antígeno de la cápside de VCA-p18 del virus de Epstein-Barr y su uso.

5 La presente invención se refiere al sector del diagnóstico de virus, especialmente el diagnóstico del virus de Epstein-Barr (EBV). Se pusieron a disposición procedimientos mejorados para la detección de infecciones por EBV y los medios adecuados para ello.

10 El virus de Epstein-Barr es un virus de herpes humano, considerado como inductor de la mononucleosis infecciosa. La infección por EBV transcurre frecuentemente de forma subclínica, que puede llevar eventualmente a manifestaciones malignas.

Significado del diagnóstico de virus de Epstein-Barr (EBV)

15 El diagnóstico de EBV posee una gran importancia para el diagnóstico diferencial, puesto que la sintomatología de las infecciones por EBV agudas pueden ir solapadas con numerosos cuadros clínicos que son provocados por otros gérmenes u otras causas. Así, una infección aguda por EBV se puede confundir con una infección primaria por VIH, una infección de rubeola, una infección de citomegalovirus, una infección con virus clásicos de hepatitis, toxoplasmosis, leptospirosis, una infección con diversos inductores neurotrópicos y con una leucemia o un linfoma.
20 Una serología de EBV unívoca representa por consiguiente una gran responsabilidad frente al paciente.

Problemas de la serología EBV

25 La serología clásica EBV se basa en la detección de la respuesta de los anticuerpos de IgG e IgM frente a los antígenos de la cápside viral (VCA) y frente a antígenos nucleares específicos de EBV (EBNA), particularmente de EBNA-1.

30 La clasificación de las diferentes clases de antígenos de EBV se basa en el ciclo biológico de la multiplicación viral con proteínas necesarias de forma temprana (EA) y tardía (VCA), así como en los antígenos para el mantenimiento de la latencia (EBNA). Estas clases de antígenos eran detectables y diferenciables en los primeros sistemas de ensayos serológicos (inmunofluorescencia con células infectadas por EBV). Todos los demás desarrollos subsiguientes de sistemas de ensayo serológicos mantenían este esquema y permitían, por consiguiente, la diferenciación de especificidades de los anticuerpos frente a EBNA, VCA y EA.

35 Los marcadores VCA y EBNA se definieron primeramente en la técnica de la inmunofluorescencia. En ensayos más modernos se utilizan los componentes p18 y p23, purificados y generalmente preparados de forma recombinante, del complejo VCA y p72, el cual corresponde a EBNA-1. El antígeno de EBNA-1 se forma tarde, después de una primera infección, con el establecimiento de células latentemente infectadas y es co-responsable para el mantenimiento de este estado. Esto significa, que el anti-EBNA-1 sólo se forma con un retraso de hasta seis meses después de la primera infección. Pero al mismo tiempo significa también que en el caso de la presencia de este marcador se puede
40 diagnosticar, con seguridad, la exclusión de una infección reciente y, con ello, se tiene un importante marcador para una secuenciación en el tiempo del momento de la infección.

45 La serología EBV presenta una elevada medida de variabilidad, ésta conduce frecuentemente a resultados falsos o demasiado imprecisos cuando se determinan sólo los marcadores clásicos VCA-IgG, VCA-IgM y anti-EBNA-1. Así, por ejemplo, no todas las infecciones agudas por EBV manifiestan una respuesta VCA-IgM detectable, de manera que aquí las estrategias analíticas, que sólo se basan en la determinación de VCA-IgG y VCA-IgM, conducen a una conclusión falsa. Por otra parte, en casos aislados, una respuesta VCA-IgM puede persistir también durante meses y simular por ello una infección reciente.

50 Un anti-EBNA-1 positivo demuestra una infección por EBV ya transcurrida y, en combinación con un VCA-IgG positivo, representa la única constelación serológica unívoca. Un anti-EBNA-1 negativo (simultáneamente con un VCA-IgG positivo) puede indicar o bien una infección aguda por EBV o puede ser provocado por pérdida secundaria de anti-EBNA-1 en el caso de inmunodepresión. Además, alrededor del 5% de los infectados no desarrollan nunca
55 anti-EBNA-1 de manera detectable y, con ello, simular de por vida la situación serológica de una infección aguda por EBV.

60 Así, por VCA-IgG y anti EBNA-1 al mismo tiempo positivos se excluye de forma segura una infección aguda por EBV. Sin embargo, VCA-IgG positivo junto a anti-EBNA-1 negativo representa una constelación incierta, la cual se presenta en tres situaciones:

- 1) en el caso de una reciente infección por EBV;
- 2) en el caso de una infección ya transcurrida y pérdida de anti-EBNA-1 por supresión del sistema inmunológico celular;
- 65 3) en el caso de una infección ya transcurrida y al mismo tiempo falta de formación de anti-EBNA-1 (en el caso de alrededor de 5% de la población sana).

ES 2 282 847 T3

Los casos 2) y 3) se pueden encontrar con más frecuencia en los temas de estudio de grandes clínicas que la infección por EBV realmente reciente.

Este problema central de la serología de EBV sólo se puede resolver hasta el momento de forma fiable por costosos ensayos adicionales o por repeticiones en el transcurso del tiempo, en relación con datos clínicos.

Por ello, la falta de anti-EBNA-1 se utilizará en general como indicador de una infección reciente. Tal como se mencionó anteriormente, esto puede conducir a interpretaciones drásticamente falsas en el caso de personas infectadas por EBV, las cuales permanecen siendo anti-EBNA-1 negativos o, en virtud de la supresión del sistema inmunológico celular, pierden anticuerpos en contra de éste. Los procedimientos con anti-EBNA-1 utilizados hasta el momento en el diagnóstico rutinario no permiten con seguridad el diagnóstico de una infección por EBV reciente.

Por una parte, la delimitación de una negatividad anti-EBNA-1 primaria en el caso de infección aguda por EBV, de una pérdida de anti-EBNA-1 y de ausencia de formación de anti-EBNA-1, por otra, representa por lo tanto el mayor problema de la serología de EBV. Esta problemática particular no se tiene en cuenta en la mayoría de las evaluaciones de ensayos serológicos publicados. Hay que suponer, que hasta un 20 por cien de los pruebas en cuanto a infección por EBV no son claras y conducen a resultados falsos. Éstas, particularmente en oncología, en la medicina de los trasplantes y en la vigilancia de los embarazos, son de enorme importancia.

Hinderer W. *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, United States, oct. 1999, tomo 37, nº 10, octubre 1999 (1999-10), páginas 3239-3244, dieron a conocer una estructura de fusión GST-p18 EBV que contiene p18 105-176. En lo referente a los anticuerpos IgG, esta estructura reconoce mejor las infecciones que ya tuvieron lugar que las infecciones primarias y reacciona también peor con anticuerpos de infecciones primarias en comparación a infecciones que ya tuvieron lugar.

Bauer (Clin Lab 2001, 47, 223-230) describe en un artículo sinóptico “inmunoblots” con antígenos recombinantes en el caso de la serología vírica de Epstein-Barr.

Tranchand-Bunel *et al.*, Journal of Clinical Microbiology 1999, 2399-2368 comentan ensayos IgM-ELISA en los cuales se emplean péptidos del antígeno de la cápside de VCA p18.

van Grunsven *et al.* (Journal of Infectious Diseases, 1994, 13-19) describen epítopes inmunodominantes en el C-terminal de la proteína de la cápside de VCA p18.

Un objeto de la presente invención es poner a punto medios para detectar una infección por EBV, los cuales hagan posible una diferenciación segura entre una infección aguda y una que ya tuvo lugar.

Sorprendentemente se encontró que por modificación del antígeno EBV de la cápside p18 viral se podía obtener un péptido que reacciona con anticuerpos, los cuales, con parecida seguridad que anti-EBNA-1, se forman de forma tardía después de una infección, y no manifiestan en igual amplitud la problemática de la no-formación o la desaparición en el caso de inmunosuprimidos.

Se trata en este caso de péptidos, que se derivan del antígeno EBV-p18, el cual se codifica por el marco de selección BFRF3. Este antígeno ya fue descrito en 1988 como marcador de VCA (Middeldorp y Herbrink, J. Virol. Meth., 21 (1988) 133-146.

El ordenamiento molecular de p18 y la representación de la proteína mediante métodos de tecnología genética, así como la utilización de determinados fragmentos de éste, inmunológicamente activos, se describen en el documento EP 574 075 A2. No obstante, en la descripción de las propiedades de los antígenos recombinantes o, respectivamente, de los fragmentos sintetizados químicamente se apuntó siempre a una reactividad óptima.

Los anticuerpos IgG contra un antígeno p18 completo, purificado, preparado de forma recombinante ya son detectables en una infección reciente por EBV y, por lo tanto, no son adecuados para discriminar entre infecciones agudas e infecciones ya transcurridas.

En el transcurso de las investigaciones se ha puesto de manifiesto, sorprendentemente, que suprimiendo por ejemplo la zona N-terminal del antígeno p18 se consigue una discriminación en el tiempo de respuestas de anticuerpos: p18 que fue acortado en el N-terminal reconoce anticuerpos que se formaron semanas después de la infección.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un péptido que se deriva del antígeno viral p18 del virus de Epstein-Barr y que, por ello, se caracteriza porque reacciona con anticuerpos de individuos con una infección por virus de Epstein-Barr que tuvo lugar hace más tiempo, pero no reacciona, o débilmente, con anticuerpos de individuos con infección aguda por virus de Epstein-Barr o que tuvo lugar recientemente, caracterizado porque frente al antígeno viral N-terminal p18 se ha acortado en 10-70 aminoácidos.

La expresión “péptido” abarca oligopéptidos y polipéptidos. La longitud de los péptidos, siempre que no se indique, no está limitada.

ES 2 282 847 T3

5 El péptido conforme a la invención es un antígeno p18 modificado, es decir no es idéntico al p18 viral, la “proteína de tipo salvaje”. Las modificaciones frente al p18 viral no están especialmente limitadas, siempre que el péptido modificado reaccione con anticuerpos de individuos con infección por EBV que tuvo lugar hace más tiempo, pero que no reacciona o lo hace débilmente con anticuerpos de individuos con infección aguda por EBV o que tuvo lugar recientemente, y el antígeno se caracteriza porque frente al antígeno p18 viral N-terminal se ha acortado en 10-70 aminoácidos.

10 El que el péptido conforme a la invención se derive del p18 significa que abarca al menos 1 fragmento con al menos 1 epítipo del antígeno p18 viral completo. Un epítipo de este tipo se presenta cuando en un “line assay” (véase ejemplo 3), en el caso de incubación con sueros de individuos con infección por EBV que tuvo lugar hace más tiempo, se obtiene una reacción positiva.

15 La secuencia de aminoácidos del p18 viral se representa en la figura 7 (SEQ ID NO:1). Por lo regular, el péptido conforme a la invención tiene una secuencia de aminoácidos discrepante de SEQ ID NO:1. En este caso se trata preferentemente de una o más deleciones y/o sustituciones. El péptido conforme a la invención presenta una o varias deleciones frente a la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:1, de modo que se han suprimido 10-70 aminoácidos en el N-terminal de p18.

20 El péptido conforme a la invención comprende, o se compone preferentemente de al menos 125 aminoácidos sucesivos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1.

Es preferible que en el péptido conforme a la invención no se presente al menos un epítipo del p18-VCA completo, en contra del cual, después de una infección, se forman anticuerpos.

25 El péptido conforme a la invención se ha acortado frente al antígeno viral p18 N-terminal en 10 a 70 aminoácidos, preferentemente en 15 a 50 aminoácidos, de modo más preferido en 20 a 40 aminoácidos y, de modo aún más preferente, en alrededor de 30 aminoácidos. En una forma de ejecución particular el péptido conforme a la invención se compone de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

30 Este secuencia de aminoácidos corresponde a los aminoácidos 31 a 176 de SEQ ID NO:1. En otras formas de ejecución preferidas, el péptido conforme a la invención tiene esencialmente una secuencia de aminoácidos que se ha seleccionado del grupo constituido por

35 aminoácidos 21 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 22 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 23 a 176 de SEQ ID NO:1,

40 aminoácidos 24 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 25 a 176 de SEQ ID NO:1,

45 aminoácidos 26 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 27 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 28 a 176 de SEQ ID NO:1,

50 aminoácidos 29 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 30 a 176 de SEQ ID NO:1,

55 aminoácidos 31 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 32 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 33 a 176 de SEQ ID NO:1,

60 aminoácidos 34 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 35 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 36 a 176 de SEQ ID NO:1,

65 aminoácidos 37 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 38 a 176 de SEQ ID NO:1,

ES 2 282 847 T3

aminoácidos 39 a 176 de SEQ ID NO:1,

aminoácidos 40 a 176 de SEQ ID NO:1, y

5 aminoácidos 41 a 176 de SEQ ID NO:1.

El experto en la materia sabe también que las propiedades inmunológicas de las secuencias indicadas frecuentemente sólo varían de forma insignificante cuando se han insertado, sustituido o suprimido aminoácidos. Las sustituciones que frecuentemente se consideran como conservadoras son aquellas en las que la naturaleza química del aminoácido a sustituir es parecida a la del aminoácido sustituido. Combinaciones de aminoácidos que se pueden considerar como conservadoras son, por ejemplo Gly/Ala, Asp/Glu, Asn/Gln, Val/Ile/Leu, Ser/Thr, Lys/Arg y Phe/Tyr.

Se pueden añadir aminoácidos adicionales o grupos químicos al N- o C-terminal, para crear un tipo de “linker” (enlazador), a través del cual el péptido se puede acoplar ventajosamente a un soporte. Un enlazador de este tipo tiene por lo regular 1 a 60 aminoácidos, pero generalmente 1 a 10 aminoácidos. Sin embargo, la unión del péptido a un soporte o a una fase sólida no tiene por qué ser covalente. Igualmente, se pueden anexionar radicales de cisteína para conseguir un acoplamiento con otros péptidos.

Los péptidos conformes a la invención pueden estar modificados ulteriormente, por ejemplo por glicosilación, amidación, carboxilación o fosforilización. La invención abarca igualmente los derivados funcionales tales como, por ejemplo, sales, amidas, ésteres, derivados C-amidados o N-acetilados.

En virtud de las informaciones en esta solicitud, el experto en la materia puede averiguar de forma sencilla si un determinado derivado de p18 es adecuado para distinguir entre una infección aguda y una infección ya transcurrida. Para ello, un derivado de p18 dado tiene que ser testado simplemente, por ejemplo en un “line assay” como el representado en el ejemplo 3.

Los péptidos conformes a la invención se pueden preparar de diferentes maneras, conocidas por el experto en la materia. Por lo regular, se preparan o bien por síntesis química o por expresión de ADN recombinante en células hospedantes adecuadas.

Como procedimientos para la síntesis química de péptidos se puede utilizar la síntesis en fase sólida o la síntesis en fase líquida. Es preferida la síntesis en fase sólida. Procedimientos para la síntesis química de péptidos se describen en Bodanszky y Ondetti: Peptide Synthesis, Interscience Publishers, Nueva York (1966); The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology Volumen 1-3 (Ed. Gross y Maierhofer) 1979, 1980, 1981 (Academic Press, Inc.).

Para la preparación recombinante del péptido conforme a la invención se dispone primeramente un ácido nucleico que codifique la secuencia de aminoácidos del péptido. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, se prefiere ADN. El ácido nucleico codificante se inserta habitualmente en un vector o en un plásmido, el cual contiene secuencias adecuadas que permiten la expresión del péptido codificado. Este tipo de secuencias adecuadas son por ejemplo un promotor, una secuencia terminadora y secuencias que posibiliten la replicación del plásmido. Se puede tratar de plásmidos de expresión para la expresión en procariontes o en eucariontes. El experto en la materia es consciente de que en este caso se utilizan diferentes secuencias promotoras. Son preferidos los plásmidos de expresión procariontícos.

La invención se refiere también a un vector o un plásmido que contiene un ácido nucleico que codifica un péptido conforme a la invención. Procedimientos habituales para la preparación de vectores y plásmidos se describen en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2001, Cold Spring Harbour Laboratory Press. Aparte de esto, el vector o el plásmido se introduce en células hospedantes adecuadas, por ejemplo células de mamíferos o, preferentemente, bacterias, y se cultiva después bajo condiciones adecuadas, de modo que tiene lugar una expresión del péptido deseado. La invención se refiere también a una célula que contiene un vector conforme a la invención o un plásmido conforme a la invención. Otro aspecto más de la invención es un procedimiento para la preparación de un péptido conforme a la invención, el cual comprende que células conformes a la invención se cultivan bajo condiciones adecuadas, de modo que se exprese el péptido deseado y, eventualmente, se obtenga el péptido. Una vez efectuada la expresión, se puede obtener el péptido por métodos en sí conocidos por el experto en la materia. Procedimientos adecuados para la expresión recombinante de péptidos se describen en Molecular Cloning: A Laboratory Manual de Sambrook *et al.* (véase más arriba).

El péptido se presenta preferentemente en forma aislada, lo que significa que está esencialmente libre de otros péptidos. La pureza del péptido conforme al invento es preferentemente superior a 90%, preferentemente mayor al 95% y, de modo muy preferido, superior al 99%, determinada con ayuda de SDS-PAGE con subsiguiente tinción con Comassie.

Después, una vez conseguida la expresión por lo regular se purifica. En este caso se pueden emplear los procedimientos de pureza más variados, conocidos por el experto en la materia. Procedimientos para la purificación de proteínas y péptidos se describen en Methods in Enzymology, vol. 182, Guide to Protein Purification, Academic Press, Nueva York 1990 o Scopes R.K., Protein Purification, editorial Springer, Heidelberg 1994.

ES 2 282 847 T3

El péptido conforme a la invención se caracteriza porque reacciona con anticuerpos de individuos con infección por virus de Epstein-Barr que tuvo lugar hace más tiempo, pero no reacciona, o débilmente, con anticuerpos de individuos con infección aguda o infección por virus de Epstein-Barr que tuvo lugar recientemente. Preferentemente, el péptido no reacciona con anticuerpos de individuos con infección por EBV que tuvo lugar recientemente. Los datos se refieren particularmente a anticuerpos IgG.

Los sueros de un individuo con infección que tuvo lugar hace tiempo pueden presentar las siguientes propiedades serológicas:

- 10 - anti-EBNA-1-IgG: positivo;
- anti-p23-IgG: positivo;
- 15 - anti-p54-IgG: negativo;
- anti-p138-IgG: negativo; y
- anti-p23-IgM: negativo.

20 El péptido conforme a la invención reacciona con anticuerpos de sueros que presentan estas propiedades serológicas.

Por lo regular, una infección que tuvo lugar hace 1,5 años se puede denominar como “infección que tuvo lugar hace tiempo”.

25 La infección de un individuo con EBV se considera “aguda” cuando se presenta el cuadro clínico de una mononucleosis infecciosa. Los sueros de individuos con infección por EBV que tuvo lugar recientemente pueden presentar las siguientes propiedades serológicas:

- 30 - anti-EBNA-1-IgG: negativo;
- anti-p54-IgG y/o anti-p138-IgG (EA): positivo;
- anti-p23-IgG (VCA): positivo; y
- 35 - anti-p54- y/o -p138- y/o -p54-IgM: positivo.

El péptido conforme a la invención no reacciona o reacciona débilmente con anticuerpos de sueros que presentan estas propiedades serológicas.

40 Por lo regular, una infección que tuvo lugar hace aproximadamente 4 semanas se puede denominar como “infección que tuvo lugar recientemente”.

45 La expresión de que un péptido “reacciona” con anticuerpos significa, en el sentido de la presente solicitud, que el péptido forma con uno o varios anticuerpos complejos inmunes antígeno-anticuerpo después de que el péptido y el anticuerpo hayan sido puestos en contacto. Ninguna reacción o una reacción débil del péptido con el anticuerpo se presenta cuando no se forman complejos antígeno-anticuerpo algunos o sólo débiles, después de que el péptido y el anticuerpo hayan sido puestos en contacto. Comprobar si un péptido reacciona con anticuerpos se puede hacer a través de un “line-assay”, como el que se representa en el Ejemplo 3.

50 La invención se refiere, además, a un péptido de fusión, el cual abarca un péptido conforme a la invención, como se describe anteriormente, y uno o varios aminoácidos adicionales, los cuales no corresponden a la secuencia de aminoácidos del antígeno viral p18. En este caso se puede tratar de secuencias extrañas de lo más variadas. Pero es preferible que en el péptido de fusión sólo haya contenidos pocos aminoácidos extraños para evitar una reacción cruzada de los aminoácidos extraños con los anticuerpos. Ejemplos de secuencias extrañas son las secuencias de aminoácidos que facilitan la purificación por afinidad del péptido expresado, por ejemplo un oligohistidin-stretch (6 a 8 radicales sucesivos de histidina) en el N- o C-terminal.

60 Otro aspecto de la invención es un reactivo diagnóstico para detectar anticuerpos contra el virus de Epstein-Barr, que abarca un péptido conforme a la invención y/o un péptido de fusión conforme a la invención. Un “reactivo diagnóstico” en el sentido de la presente invención abarca una fase sólida o una sustancia detectora. Fases sólidas pueden ser, por ejemplo, placas para microtitulación, cubetas, recipientes, membranas, filtros, tiras o partículas para ensayo tales como esferitas. Procedimientos para la unión de péptidos a superficies sólidas o fases sólidas son en sí conocidas por el experto en la materia.

65 Sustancias detectoras pueden ser, por ejemplo isótopos radiactivos, compuestos fluorescentes, enzimas, colorantes, etc. Los péptidos o péptidos de fusión conformes a la invención pueden estar marcados o no marcados según la

utilización que se pretenda. El marcado puede ser de cualquier tipo, por ejemplo enzimático, químico, fluorescente, luminiscente o radiactivo.

5 Anticuerpos contra virus de Epstein-Barr se pueden detectar por ejemplo poniendo en contacto un reactivo para diagnóstico conforme a la presente invención con suero procedente de un individuo y, a continuación, detectando los complejos antígeno-anticuerpo formados. Por lo tanto, la invención se refiere igualmente a un procedimiento para detectar en una muestra anticuerpos contra virus de Epstein-Barr, el cual comprende el poner en contacto con la muestra un péptido o un péptido de fusión conforme a la invención o un reactivo para diagnóstico conforme a la invención y, a continuación, detectar los complejos antígeno-anticuerpo formados.

10 La muestra es generalmente un líquido corporal procedente de un individuo. Preferentemente, la muestra es suero que procede de un individuo. El suero se puede diluir con un líquido adecuado.

15 Habitualmente, en el procedimiento conforme a la invención se emplea un reactivo para diagnóstico como el descrito anteriormente. En función de la naturaleza y de otras características del reactivo para diagnóstico, la reacción inmunoquímica es una reacción denominada "sandwich", una reacción de aglutinación, una competición o una inhibición.

20 En un formato preferido de la invención, el péptido o péptido de fusión conforme a la invención está inmovilizado sobre una fase sólida. La fase sólida se pone en contacto después con la muestra a examinar, por ejemplo suero, por lo que se pueden formar complejos antígeno-anticuerpo. La fase sólida se lava a continuación una o varias veces para separar los anticuerpos no ligados. A continuación, se detectan los complejos antígeno-anticuerpo inmovilizados. Esto puede tener lugar, por ejemplo, por los denominados anti-anticuerpos, acoplados a una sustancia de marcado. Así, después del lavado la fase sólida se puede poner en contacto con un anti-IgG-anticuerpo acoplado a peroxidasa de rábano. Este anti-anticuerpo se une a los inmunocomplejos inmovilizados. El anticuerpo secundario ligado se puede hacer visible, de manera conocida, por la reacción enzimática de la peroxidasa de rábano. El anticuerpo secundario reconoce preferentemente, de manera específica, IgG humano.

30 En el procedimiento se emplean preferentemente membranas o tiras de ensayo, sobre las cuales están inmovilizados uno o varios antígenos. En otra forma de realización de la invención se lleva a cabo un ensayo ELISA. Para el experto en la materia es conocido el modo de llevar a cabo este tipo de procedimientos. Una vista sinóptica sobre procedimientos de detección adecuados se encuentra en "Labor und Diagnose"; L. Thomas; Die medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg; ISBN 3-921320-21-6.

35 Para llevar a cabo un ELISA se ligan habitualmente un péptido o una mezcla de varios péptidos a una fase sólida, por ejemplo a una placa para microtitulación. Una adecuada dilución del líquido corporal a ensayar (suero) se pone en contacto con la fase sólida a la que están ligados el o los péptidos. La subsiguiente incubación se lleva a cabo durante un espacio de tiempo que es suficiente para la formación de complejos antígeno-anticuerpo. A continuación, se separan por lavado los componentes no ligados. La detección de los inmunocomplejos tiene lugar generalmente a través de anticuerpos que se unen específicamente a inmunoglobulinas humanas y que están marcados (marcadores adecuados, véase más arriba). Frecuentemente, después de la adición de un sustrato se forma un producto el cual puede ser detectado fácilmente de forma visual fotométricamente, espectrométricamente, luminométricamente o electroquímicamente.

45 Otra variante es el ensayo de competición, conocido también por el experto en la materia.

50 En una forma de ejecución preferida del procedimiento, otro antígeno del virus de Epstein-Barr se pone en contacto con la muestra y, a continuación, se detectan los complejos antígeno-anticuerpo formados. En el caso del otro antígeno del EBV se trata preferentemente de un antígeno característico de una infección reciente, El otro antígeno se elige preferentemente del grupo constituido por p18, p23, p138 y p54. En otra forma de ejecución del procedimiento, junto al péptido o péptido de fusión conforme a la invención se emplea el antígeno nuclear tardío EBNA-1 (p72). En otra forma de ejecución, junto al péptido o péptido de fusión conforme a la invención se emplean los antígenos p72, p18, p23, p138 y/o p54.

55 Otro aspecto de la invención es un estuche de ensayo para la detección de anticuerpos contra virus de Epstein-Barr, que comprende un péptido o péptido de fusión conforme a la invención y/o un reactivo para diagnóstico, como se describió anteriormente. El estuche de ensayo puede contener otros medios adecuados para llevar a cabo el procedimiento conforme a la invención, por ejemplo una composición que contiene un anticuerpo secundario. El estuche de ensayo contiene preferente-mente una fase sólida. Particularmente preferidas son en este caso las tiras para ensayo "Western-Blot", sobre las cuales está inmovilizado al menos un péptido o péptido de fusión. Pueden estar inmovilizados otros antígenos de EBV, por ejemplo p18, p23, p72, p54 y/o p138. En este caso se puede tratar de tiras de nitrocelulosa. El estuche de ensayo puede comprender, además, soluciones de lavado, eventualmente en forma concentrada.

65 Otro aspecto de la invención es la utilización de un antígeno modificado de la cápside viral, del virus de Epstein-Barr para determinar si en una muestra se presenta una infección por EBV aguda, una que tuvo lugar recientemente o que tuvo lugar hace más tiempo o una ya transcurrida. Las formas de ejecución preferidas de la utilización conforme a la invención corresponden a las formas de ejecución preferidas del péptido, del péptido de fusión, del reactivo para diagnóstico, del estuche de ensayo y/o del procedimiento. La invención se refiere, además, a la utilización de un

antígeno modificado de la cápside viral del virus de Epstein-Barr para la discriminación serológica en la muestra de infecciones recientes/que tuvieron lugar hace poco tiempo y las ya transcurridas. La invención se refiere, además, a la utilización de un antígeno modificado de la cápside viral del virus de Epstein-Barr para la detección de anticuerpos contra EBV. En este caso, en la muestra se puede distinguir preferentemente entre una infección reciente y una infección ya transcurrida. La invención se refiere, además, a la utilización de un antígeno modificado de la cápside viral del virus de Epstein-Barr para la detección de una infección por EBV ya transcurrida. Finalmente, la invención se refiere a la utilización de un antígeno modificado de la cápside viral del virus de Epstein-Barr para la distinción entre una infección ya transcurrida y una infección reciente por EBV.

El antígeno modificado de la cápside viral, conforme a las utilizaciones de la invención corresponde preferentemente al péptido o péptido de fusión conforme a la invención. Todas las demás variantes preferidas de la invención, descritas anteriormente, son válidas para las utilizaciones de la invención conformes al sentido de la misma.

Todos los aspectos y formas de ejecución preferidas de la invención, descritos en la presente solicitud, se pueden combinar entre sí de la manera más variada. La invención comprende igualmente este tipo de combinaciones.

Por la presente invención, junto al EBNA-1 se pone a disposición un segundo marcador tardío, el cual, además, no presenta la problemática de la no formación de anticuerpos. En contraposición con EBNA-1, no se pierden anticuerpos contra p18 después de la inmunosupresión celular. La detección de IgG contra un p18 modificado conforme a la invención representa, por lo tanto, una exclusión segura de una infección aguda por EBV.

Por lo tanto, mediante la utilización de p18 modificado en sistemas de medición adecuados, tal como por ejemplo el inmuno-blot, se pueden detectar también infecciones por EBV recientes y ya transcurridas, aun cuando la respuesta anti-EBNA muestre un transcurso atípico.

La Figura 1 muestra el incremento de la fuerza de expresión del diagnóstico de EBV por la utilización de un antígeno p18 modificado.

La figura muestra esquemáticamente en la mitad superior un inmuno-blot convencional para la determinación de anticuerpos contra EBV y, en la parte inferior, un ensayo conforme a la invención, el cual contiene adicionalmente antígeno p18 acortado en el N-terminal (designado sobre la tira como "p18"). Los marcadores p23 (VCA), p54 (antígeno precoz) y p138 (antígeno precoz) representan marcadores seropositivos, los cuales no pueden diferenciar entre infecciones recientes e infecciones ya transcurridas. La respuesta de los anticuerpos frente a estos marcadores es variable, de modo que se pueden reconocer diferentes muestras de la respuesta inmune. El carácter positivo de la respuesta de los anticuerpos frente al menos uno de estos marcadores permite el diagnóstico de "infectado por EBV", sin más diferenciación entre "infección reciente" e "infección ya transcurrida". Una respuesta IgG positiva frente a p72 (= EBNA-1) permite el diagnóstico seguro de "infección ya transcurrida". En el ensayo convencional se reconoce correctamente la clásica infección por EBV ya transcurrida (A1) en virtud del p72-IgG positivo, mientras que una infección por EBV ya transcurrida sin formación de p72-IgG (A2) o una infección por EBV ya transcurrida con subsecuente pérdida secundaria de p72-IgG (A3) no se pueden diferenciar de una infección por EBV real, reciente (B), con respuesta de p72-IgG aún no formada. Por lo tanto, los casos A2 y A3 en el ensayo convencional se diagnostican por lo general erróneamente. Sin embargo, en la praxis diaria estos casos son más frecuentes que las infecciones reales por EBV, recientes.

En el caso de utilizar el ensayo modificado (mitad inferior), el cual contiene, por ejemplo, p18 acortado en posición N-terminal (designado en la Figura 1 como "p18"), se diferencia claramente la infección por EBV reciente con falta de p18-IgG (B) de las infecciones por EBV ya transcurridas (A1-A3), incluso cuando falta p72-IgG.

La Figura 2 muestra la expresión de diferentes péptidos. Se representa un gel de poli(acrilamida)-SDS, teñido con azul de Coomassie, de lisados de clones expresantes de *E. coli* después de la inducción (véase el Ejemplo 1). Las huellas corresponden a las siguientes tandas:

- huella 1: expresión del p18 (p18-30) acortado en el N-terminal
- huella 2: expresión de p18 completo en vector pDS
- huella 3: expresión de p18 completo en vector pQE
- huella 4: marcador del peso molecular

Las diferencias de tamaño del antígeno p18 completo se basan en los diferentes aminoácidos N-terminales; el vector pQE posee una cadena adicional de histidina.

El p18 acortado en el N-terminal muestra, tal como se esperaba, un peso molecular 4 kDa menor.

La Figura 3 muestra la reactividad de los péptidos en el inmunoblot. Lisados de clones de *E. coli* inducidos con las dos variantes de p18 se separaron por electroforesis en gel y, a continuación, fueron transferidos sobre membranas de nitrocelulosa (Western Blot).

ES 2 282 847 T3

huella 1: p18 completo sin His-tag

huella 2: p18-30 (versión acortada de p18)

5 Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con sueros de personas EBV-positivas; a continuación, los anticuerpos ligados específicamente se hicieron visibles con un segundo anticuerpo anti-IgG-humano conjugado con peroxidasa, y tinción con TMB.

A; suero de un paciente con infección por EBV reciente

10

B; suero con infección por EBV que tuvo lugar hace mucho tiempo

La Figura 4 muestra una comparación de la reactividad del p18 acortado en el N-terminal con un p18-VCA de longitud completa en un ensayo para anticuerpos de EBV, adquirible comercialmente, en base a tiras (razón social Viramed, Planegg - ViraStripe EBV).

15

En cada caso, 10 sueros de personas con infección por EBV que tuvo lugar hace mucho tiempo, pero con serología problemática (bajo título de anticuerpos, falta de anti-EBNA-1; A) y 10 muestras de pacientes con infección por EBC reciente (B) se sometieron a ensayos con dos versiones de las tiras de antígenos de EBV:

20

Las tiras de "microgen" contienen junto al p18 acortado en el N-terminal los antígenos de EBV adicionales EBNA-1, p23 (VCA), así como p54 y p138 (EAs).

Las tiras de Viramed contienen junto a un antígeno p18 completo, también proteínas de EBV, EBNA-1, EA-p54, así como gp125 (VCA).

25

En la parte media de la izquierda (ensayo con microgen) "p18" designa el p18 acortado en el N-terminal. En la parte media de la derecha (ensayo con Viramed) "p18" designa el p18 viral en toda su longitud.

En las infecciones que tuvieron lugar hace tiempo (A) se puede encontrar en los dos ensayos una reacción anti-p18 más o menos acusada.

30

Sin embargo, en el ensayo con p18 acortado en el N-terminal los sueros de pacientes después de una infección reciente (B) no muestran en ningún caso una reacción, pero con el Virastripe (p18 completo), en todas las muestras.

35

La Figura 5 muestra una comparación de la reactividad de un ensayo conforme a la invención con un sistema ELISA obtenible comercialmente.

32 muestras de pacientes con infección por EBV reciente ("aguda") y 25 muestras de suero de personas con infección por EBV ya transcurrida (antigua) ("past") se ensayaron en cada caso con p18 acortado en el N-terminal (rociado sobre tiras de nitrocelulosa, Microgen, (compárese con tiras de antígeno de la Figura 4) y un ELISA comercial (razón social Sorin) con antígeno p18-VCA convencional.

40

En los dos diagramas se han representado en cada caso, uno frente a otro, los DO de ambos ensayos; eje-x - intensidad de la banda con el p18 acortado en el N-terminal; eje Y - valores del ELISA con p18 completo. Los valores DO del ELISA se obtuvieron por medio de un "ELISA-reader" corriente y se sitúan entre 0 y 3,0; las tiras de nitrocelulosa con el p18 acortado en el N-terminal se introdujeron por escaner y la intensidad de la banda se determinó mediante un programa de "software"; la escala abarca en este caso valores de 0 a 200. Las dos líneas adicionales representan los correspondientes límites de corte (cut-off).

45

La Figura 6 muestra la correlación de la reactividad de p18 en diferentes formatos de ensayo.

Los resultados del ensayo de sueros con infecciones recientes y ya transcurridas del Ejemplo 4 (Figura 5) se examinaron adicionalmente en ensayos en tiras con VCA-p18 convencional (razón social Viramed) y los resultados se correlacionaron con los valores del VCA-ELISA y la reactividad con el p18 acortado en el N-terminal.

55

La evaluación gráfica tuvo lugar de forma parecida que en el ejemplo descrito anteriormente: eje-x - con los valores DO del ELISA (de 0 a 3,0); eje Y - con reactividades de p18 de las dos ensayos en tiras (círculos abiertos - razón social Viramed con p18 completo; puntos - antígeno de p18 acortado en el N-terminal).

60

Los siguientes ejemplos explican con más detalle la invención.

Ejemplo 1

65 *Representación recombinante de antígeno p18 completo y antígeno p18 acortado en el N-terminal*

Como ejemplo de un p18 acortado en el N-terminal se describe la clonación por expresión de un antígeno, al cual, frente al p18 viral completo, le faltan 30 aminoácidos en el N-terminal.

ES 2 282 847 T3

La zona que codifica los aminoácidos 31-176 del antígeno p18 se amplificó mediante PCR y los correspondientes cebadores se amplificaron a partir de oligonucleótidos procedentes de ADN-EBV aislado (cepa B95-8).

(Marco de selección BFRF3; datos de la secuencia según anotación del banco de genes).

Cebador del p18 completo:

Cebador 5':

GAG *GGA TCC* ATC ATG AAA **CGC CGG CTG CCC AAG CCC ACC** (SEQ ID NO:3)

Cebador 3':

CGC *CTG CAG TTA* **CTG TTT CTT ACG TGC CCC GCG** (SEQ ID NO:4)

Cebador del p18 acortado:

Cebador 5':

GAG *GGA TCC* **CTG AAC CAG AAT AAT CTC CCC** (SEQ ID NO:5)

Cebador 3':

CGC *CTG CAG TTA* **CTG TTT CTT ACG TGC CCC GCG** (SEQ ID NO:6)

Los nucleótidos en letra negrilla corresponden a secuencias que codifican p18; los nucleótidos en letra cursiva representan puntos de corte de las enzimas de restricción, que fueron empleadas para otras etapas de clonación (GGATCC - BamHI; CTGCAG - Pst I).

Los PCR se llevaron a cabo en tandas de 100 μ l según métodos estándar y tampones estándar (94°C desnaturalización 1 min; 55°C unión del cebador 1 min; 72°C síntesis 1 min; en total 40 ciclos).

Después de examinar los productos de PCR a tamaño real en la electroforesis en gel (aproximadamente 530 nt para p18 completo y aproximadamente 440 nt para p18 acortado) se purificaron y desalificaron los dos mediante métodos convencionales, se cortaron a continuación mediante BamHI y PstI y, finalmente, se insertaron en los puntos correspondientes del vector de expresión pDS1.

pDS1 es un vector con resistencia a la ampicilina y un promotor-lac optimizado, y, a continuación, inicio de la traslación con el BamHI y Pst I en puntos que proporcionan una correcta traslación de los productos de PCR en el marco de selección correcto.

También son adecuados otros sistemas de expresión.

Para fines comparativos, finalmente se insertó además el fragmento que codifica el p18 completo en el vector comercial pQE30 (QIAGEN).

Después de la transformación, clones de *E. coli* se indujeron con plásmido de expresión e injertos correctos según métodos estándar y los lisados se analizaron por electroforesis SDS en gel y subsiguiente tinción con Comassie.

Ambas tandas muestran una clara expresión de p18 o, respectivamente, de derivado de p18, recombinante. El p18 completo posee un peso molecular de aproximadamente 22 kDa, la proteína acortada en 30 aminoácidos en posición N-terminal posee un tamaño de aproximadamente 18 kDa con un rendimiento de expresión algo reducido.

La expresión pQE30 del p18 completo se sitúa en cuanto a rendimiento en un intervalo parecido, el producto es algo mayor (Fig. 2) en virtud de los radicales histidina adicionalmente presentes.

Ejemplo 2

Comparación de la reactividad de p18 completo con antígeno p18 acortado en el N-terminal

Los lisados de los clones con p18 completo, así como con p18 acortado, se separaron de nuevo por electroforesis en gel, fueron transferidos sobre nitrocelulosa y, a continuación, se examinaron en cuanto a su reactividad con diversos sueros EBV-positivos.

Para ello, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con sueros diluidos 1:100 y los anticuerpos específicos se hicieron visibles con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa y subsiguiente reacción con colorante.

ES 2 282 847 T3

Los tampones, las diluciones y los tiempos de incubación se llevaron a cabo análogamente al EBV-Western Blot “recomBlot EBV”, desarrollado por Microgen.

Se pueden aplicar igualmente otros procesos Western Blot o procedimientos de tinción.

En cada caso, se sometió a ensayo un suero después de una infección reciente (de hace aproximadamente 3 semanas), así como uno con infección que tuvo lugar hace mucho tiempo (aproximadamente hace 1,5 años) (Figura 3).

Sorprendentemente, se pone de manifiesto aquí que el antígeno p18 completo, en comparación con la versión acortada, presenta claras diferencias de reactividad:

en el caso de una infección que tuvo lugar hace tiempo, ambas variantes de antígeno reaccionan aproximadamente con igual potencia; sin embargo, en el caso de sueros de infecciones recientes sólo el antígeno p18 completo muestra una clara reacción.

Con ello resulta un segundo marcador (junto a EBNA-1), el cual se puede utilizar para la situación en el tiempo de una infección por EBV.

Ejemplo 3

Comparación de la reactividad con ensayos de “Immunodots”, obtenibles comercialmente

La variante acortada del antígeno p18 se expresó en cantidades mayores y se purificó mediante métodos convencionales; esencialmente, las etapas eran en este caso:

- lisis de las células de *E. coli* inducidas con el producto de expresión;
- separación por centrifugación de p18 en forma de cuerpos de inclusión (inclusión bodies) insolubles;
- lavado del grano (pellet) insoluble con diversos detergentes no iónicos;
- disolución de los gránulos restantes con el p18 en tampón urea 8 M.
- diferentes cromatografías de intercambio iónico: DEAE, Q-sefarosa, S-sefarosa (todos Pharmacia).

La proteína se puede obtener así con una pureza > 99%.

De forma alternativa, también se pueden utilizar otros procedimientos de purificación o series de etapas en columna. En el caso de utilizar el producto pQE30-p18 se puede aprovechar también, especialmente la unión selectiva a columnas de quelato de níquel.

El producto purificado se examinó en un “line assay” en cuanto a su reactividad con anticuerpos de individuos infectados por EBV. Para ello, el producto junto con otros antígenos EBV recombinantes (EBNA-1, p23-VCA, p138-EA, p54-EA) se aplicó en líneas estrechas sobre membranas de nitrocelulosa mediante una denominada aguja de delineante (isoflow, razón social Imagen Inc.) y, a continuación, se siguió procesando en tiras de ensayo (saturación de puntos sin unir en la membrana, aplicación de marcaciones, cortado en tiras estrechas). El principio del ensayo del “line assay” corresponde al inmunoensayo obtenible comercialmente “recomLine EBV IgG” de la razón social Microgen (artículo nº 4572).

Las tiras se ensayaron con sueros de infecciones por EBV recientes e infecciones ya transcurridas. Para ello, las tiras se incubaron con suero diluido a 1:100. Después de lavar tres veces, siguió una incubación con anti-IgG-humano (conjugado de peroxidasa de rábano). Después de nuevos lavados (por triplicado) se incubó con solución sustrato de TMB. Tan pronto como se pudo ver la banda de control “cut off”, se separó la solución sustrato y las tiras se lavaron con agua. Una reacción se considera como positiva, cuando la intensidad de una banda es igual o mayor que la de la banda de control cut off. Por consiguiente, un péptido reacciona con un anticuerpo cuando se obtiene una intensidad de banda igual al valor del “cut off” o superior al valor del “cut off”. Ninguna reacción o una reacción débil significa ninguna banda o una banda con una intensidad situada por debajo del valor del “cut off”. En este ensayo, un valor del cut off se define por el hecho de que la débil intensidad de tinción de una denominada banda de control sobre la tira (“banda de “cut off”) se utiliza como valor límite para el dictamen de la reactividad de las bandas de antígenos (véase por ejemplo el inmunoensayo “recomLine EBV IgG” de la razón social Microgen, anteriormente citado). La débil tinción de la banda “cut off” es siempre igual en todas las actuaciones y muestras de pacientes debido a la utilización de determinados reactivos.

Como comparación, se llevó a cabo un ensayo de tira, comercial de la razón social Viramed, Planegg (EBV-ViraStripe), el cual es muy parecido a la tira descrita anteriormente, pero que en parte presenta otros antígenos de EBV, entre ellos también un p18 completo.

ES 2 282 847 T3

Tal como se desprende claramente de las tiras inmuno-coloreadas de la Figura 4, el p18 completo (a la derecha) y, respectivamente, el p18 acortado en el N-terminal (a la izquierda) se reconocen igual de bien en los dos ensayos de sueros con infección por EBV ya transcurrida, las reactividades se parecen mucho. Por el contrario, más clara es la diferencia en el caso de los sueros de infectados recientes por EBV:

En el caso del ensayo comparativo con p18 convencional esto se reconoce con más o menos intensidad en todos los casos; en las tiras con el antígeno p18 acortado no se encuentra una reacción en ninguno de los casos recientes.

Esto confirma de nuevo la validez y fiabilidad del p18 modificado para una interpretación del estatus del EBV.

Ejemplo 4

Comparación de la reactividad con un sistema ELISA adquirible comercialmente

32 muestras de pacientes con infección por EBV reciente (“aguda”) y 25 muestras de suero de personas con infección por EBV ya transcurrida (antigua) (“past”) se ensayaron en cada caso con el p18 acortado del Ejemplo 3 (rociado sobre tiras de nitrocelulosa, line assay p18) y un ELISA comercial (antígeno de la cápside Epstein-Barr ETI-VCA-G; razón social DiaSorin) con antígeno VCA convencional (Figura 5).

En los dos diagramas se han representado en cada caso, uno frente a otro, los DO de ambos ensayos; el eje-x - corresponde a la intensidad de la banda con el p18 acortado; el eje Y - corresponde a los valores del ELISA con p18 completo.

Los valores DO del ELISA se obtuvieron por medio de un ELISA-reader corriente y se sitúan entre 0 y 3,0; las tiras de nitrocelulosa con el p18 acortado se obtuvieron por escaner y la intensidad de la banda se determinó mediante un programa de “software”; la escala abarca en este caso valores de 0 a 200.

Las dos líneas adicionales representan los correspondientes límites de corte (cut-off).

Claramente se pueden reconocer las diferencias de reactividad:

En el caso de las infecciones que tuvieron lugar hace tiempo la distribución de la reactividad se parece en gran medida - los sueros altamente positivos en uno de los ensayos se reconocen en el otro generalmente también como fuertemente positivos - es decir, en el caso de infecciones ya pasadas, el antígeno ELISA y el p18 acortado reaccionan de forma muy parecida.

Drásticamente diferente es el cuadro en el caso de infecciones recientes: en los valores del ELISA - como también en el caso de infecciones que tuvieron lugar hace tiempo - aparecen todos los valores entre el límite “cut off” y el altamente positivo (DO 3,0); no se puede reconocer diferencia alguna con el cuadro del caso de infecciones ya transcurridas.

Sin embargo, los valores DO del p18 acortado se sitúan en su mayor parte por debajo del límite del cut-off y sólo en dos casos en la zona débilmente positiva. Esto demuestra de forma muy contundente la diferente reactividad del p18 acortado en el caso de infecciones recientes e infecciones ya transcurridas.

Ejemplo 5

Examen comparativo de la reactividad del p18 en diferentes formatos de ensayo

En un estudio ulterior se examinaron adicionalmente infecciones recientes e infecciones ya transcurridas del Ejemplo 4 en ensayos en tiras con VCA-p18 convencional (razón social Viramed) y se correlacionaron los resultados con los valores del VCA-ELISA y de la reactividad con el p18 acortado del Ejemplo 3 (Figura 6).

La evaluación gráfica se efectuó de forma parecida a como se describe en el ejemplo anterior:

sobre el eje X se indican los valores DO del ELISA (de 0 - 3,0); el eje Y corresponde a las reactividades de p18 de las dos ensayos en tiras (círculos abiertos - p18 completo (razón social Viramed), puntos - antígeno p18 acortado).

En el cuadro de los sueros con infecciones ya transcurridas, todos los sueros son - como se esperaba - positivos en ELISA y al mismo tiempo también son reactivos en los dos ensayos en tiras, es decir el formato del ensayo no tiene influencia.

En el caso de sueros de infecciones recientes se pone nuevamente de manifiesto, sin embargo, la reactividad totalmente diferente del p18 acortado: los valores del ELISA se dispersan - tal como se esperaba - en la zona del cut off hasta el muy reactivo; el mismo dibujo poseen los sueros en el ensayo en tiras con el p18 completo; por el contrario el antígeno p18 acortado está en la zona negativa o - en el caso de dos muestras - en la zona débilmente positiva.

Esta evaluación confirma nuevamente de forma muy unívoca la incapacidad de los sistemas de ensayo de EBV disponibles hasta el momento para diferenciar una infección ya transcurrida y una reciente con un marcador VCA. Mediante las medidas descritas, un antígeno p18 modificado (acortado en el N-terminal) puede realizar esta diferenciación.

5

Con ello, en el caso de la utilización del p18 acortado, se ha encontrado en la mayoría de los casos otro seguro marcador para el diagnóstico de una infección reciente, el cual en combinación con los conocidos marcadores de EBV puede aportar una sensible mejora y seguridad en la interpretación del estado serológico de EBV.

10 Otras citas bibliográficas

G. **Bauer**. Die Aussagemöglichkeiten der Epstein-Barr-Virus-Diagnostik *Der Internist* 33: 586-592 (1992).

15 G. **Bauer**, Epstein-Barr-Virus: Bedeutung und Möglichkeiten der Labordiagnostik *Therapeutische Umschau* 51: 558-562 (1994).

G. **Bauer**. Diagnostik der Herpesviren, Teil I: Epstein-Barr-Virus (EBV) und Zytomegalievirus (CMV). *mta* 10, 502-508 (1995).

20 G. **Bauer**. Diagnostik der Herpesviren. Teil II: Herpes simplex-Virus (HSV), Varizella-Zoster-Virus (VZV) und Humanes Herpesvirus-6 (HHV-6). *mta* 10, 587-593 (1995).

G. **Bauer**. Rationale und rationelle EBV-Diagnostik. *Clin. Lab.* 41, 623-634 (1995).

25 G. **Bauer**. IgM - ein variabler und mehrdeutiger diagnostischer Marker. *Der Mikrobiologe* 6: 44-51 (1996).

T. **Wolter**, C. **Gassmann**, V. **Vetter** and G. **Bauer**. Avidity determination: utilization of a basic immunological mechanism allows to improve serological diagnosis of infections. *Clin. Laboratory* 43: 125-135, 1997.

30 M. **Kampmann**, K. **Henninger** and G. **Bauer**. Determination of antibodies directed specifically against Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) by anticomplementary Immunofluorescence (ACIF). *Med. Microbiol. Letters* 2: 1-8 (1993).

35 M. **Schillinger**, M. **Kampmann**, K. **Henninger**, G. **Murray**, I. **Hanselmann**, and G. **Bauer**. Variability of humoral immune response to acute Epstein-Barr virus (EBV) Infection: evaluation of the significance of serological markers. *Med. Microbiol. Letters* 2: 295-303 (1993).

H.-J. **Sohn** and G. **Bauer**. Absorption of IgG increases the sensitivity of detection of the Epstein-Barr virus capsid antigen-specific IgM test. *Med. Microbiol. Letters* 2: 371-378 (1993).

40

V. **Vetter**, L. **Kreutzer** and G. **Bauer**. Differentiation of primary from secondary anti-EBNA-1-negative cases by determination of avidity of VCA-IgG. *Clinical and Diagnostic Virology*, 2: 29-39. (1994).

45 A. **Andersson**, V. **Vetter**, L. **Kreutzer** and G. **Bauer**. The avidities of IgG directed against viral capsid antigen (VCA) or early antigen (EA): useful markers for a more significant Epstein-Barr virus serology. *J. Med. Virol.*, 43: 238-244 (1994).

G. **Sigel**, M. **Schillinger**, K. **Henninger** and G. **Bauer**. IgA directed against early antigen of Epstein-Barr virus is no specific marker for the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *J. Med. Virol.*, 43: 222-227 (1994).

50

W. **Karner** and G. **Bauer**. Activation of a varicella zoster virus-specific IgA response during acute Epstein-Barr virus infection. *J. Med. Virol.*, 44: 258-262 (1994).

55 C. **Rapp**, H. **Berthold** and G. **Bauer**: Loss of Anti-EBNA-1 during active hepatitis B virus infection: A diagnostic problem and indication for HBV-induced transient cellular immunosuppression. *Med. Microbiol. Letters*, 3: 235-243 (1994).

C. **Alpers**, C. **Scheid** and G. **Bauer**. Acute EBV infection results in IgM responses against unrelated viruses. *Med. Microbiol. Letters* 3: 306-314 (1994).

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Péptido que se ha derivado del antígeno viral p18 del virus de Epstein-Barr, y que reacciona con anticuerpos de individuos con infección con virus de Epstein-Barr que tuvo lugar hace tiempo, pero no reacciona, o débilmente, con anticuerpos de individuos con infección aguda por virus de Epstein-Barr o que tuvo lugar recientemente, **caracterizado** porque frente al antígeno viral p18 está acortado en el N-terminal en 10 a 70 aminoácidos.

2. Péptido según la reivindicación 1, **caracterizado** porque presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

10 3. Péptido de fusión que comprende un péptido según una de las reivindicaciones 1 o 2 y uno o varios aminoácidos más, los cuales no corresponden con la secuencia de aminoácidos del antígeno viral p18.

15 4. Reactivo para diagnóstico para la detección de anticuerpos contra el virus de Epstein-Barr que comprende un péptido según una de las reivindicaciones 1 o 2 y/o un péptido de fusión según la reivindicación 3.

5. Estuche de ensayo de anticuerpos contra el virus de Epstein-Barr que comprende un péptido según una de las reivindicaciones 1 o 2 y/o un péptido de fusión según la reivindicación 3 y/o un reactivo para diagnóstico según la reivindicación 4.

20 6. Procedimiento para la detección de anticuerpos contra el virus de Epstein-Barr en una muestra, el cual consiste en que un péptido según una de las reivindicaciones 1 o 2 o un péptido de fusión según la reivindicación 3 o un reactivo para diagnóstico según la reivindicación 4 se pone en contacto con la muestra y, a continuación, se detectan los complejos de antígeno-IgG-anticuerpo formados.

25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque al menos un antígeno adicional del EBV se pone en contacto con la muestra y, a continuación, se detectan los complejos de antígeno-anticuerpo formados.

30 8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el otro antígeno de EBV reacciona con anticuerpos de individuos con infección aguda por EBV o que tuvo lugar recientemente.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el otro antígeno de EBV se selecciona del grupo constituido por los antígenos virales del EBV p18, 023, p72, p138 y p54.

35 10. Utilización de un antígeno modificado de la cápside viral del virus de Epstein-Barr, para la determinación en una muestra a analizar, si

a) existe una infección aguda por EBV o una que tuvo lugar recientemente, o

40 b) una infección ya transcurrida o que tuvo lugar hace más tiempo,

caracterizada porque el antígeno de la cápside viral, modificado, es un péptido según una de las reivindicaciones 1 o 2.

45 11. Vector o plásmido que contiene un ácido nucleico, el cual codifica un péptido según una de las reivindicaciones 1 o 2, o un péptido de fusión según la reivindicación 3, **caracterizado** porque por la expresión en una célula hospedante adecuada se puede obtener un péptido según una de las reivindicaciones 1 o 2 o un péptido de fusión según la reivindicación 3.

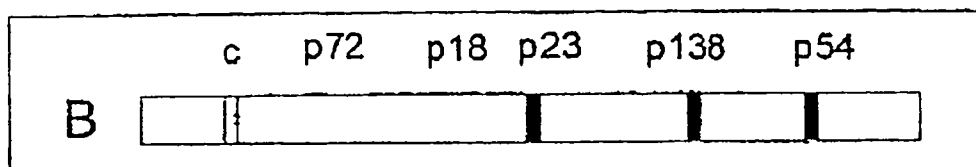
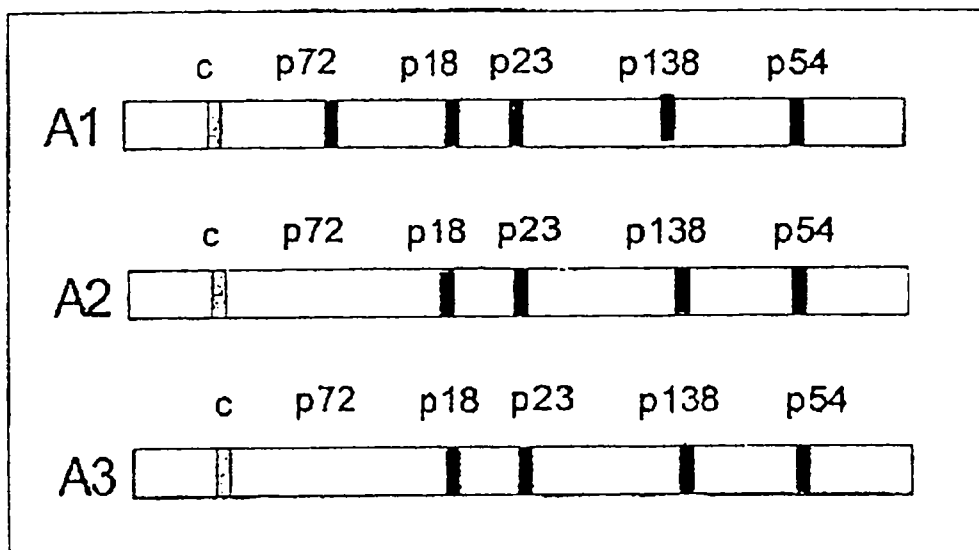
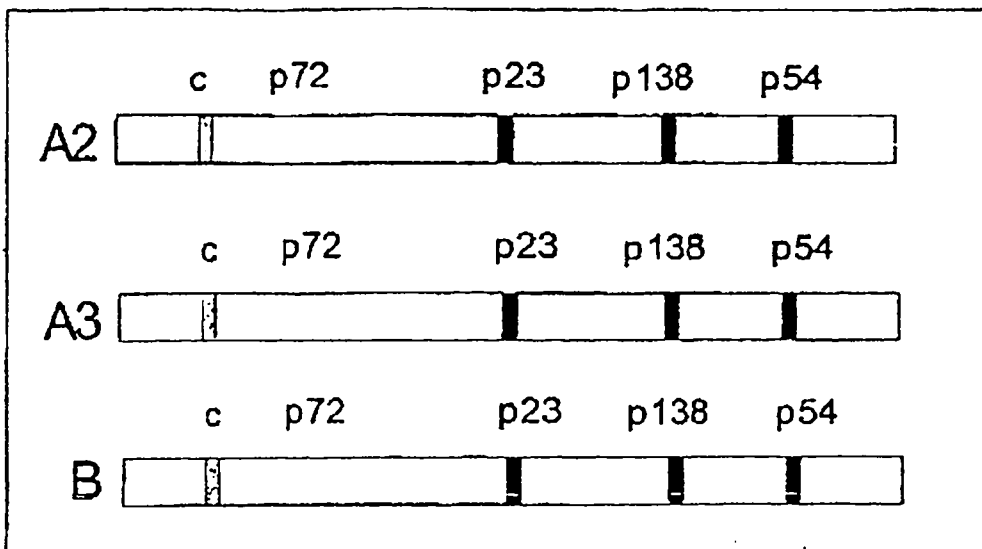
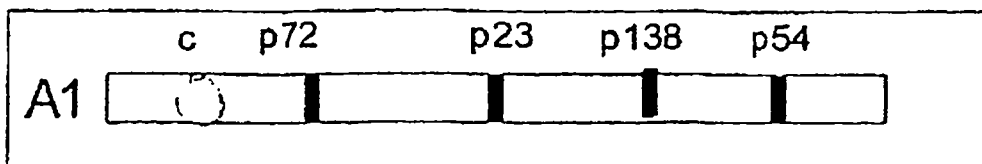
50 12. Célula que contiene un vector o un plásmido según la reivindicación 11.

55

60

65

Figura 1



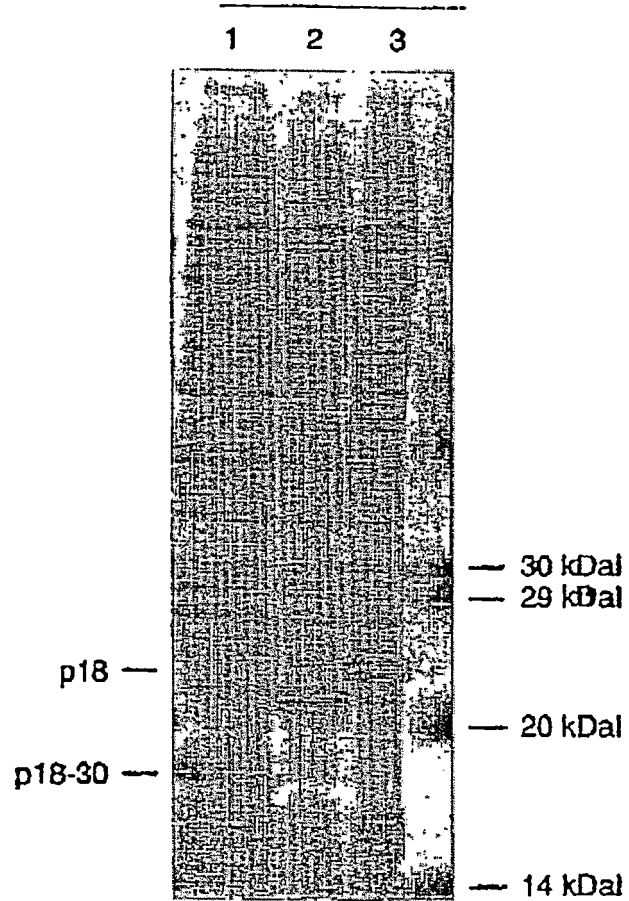


Figura 2

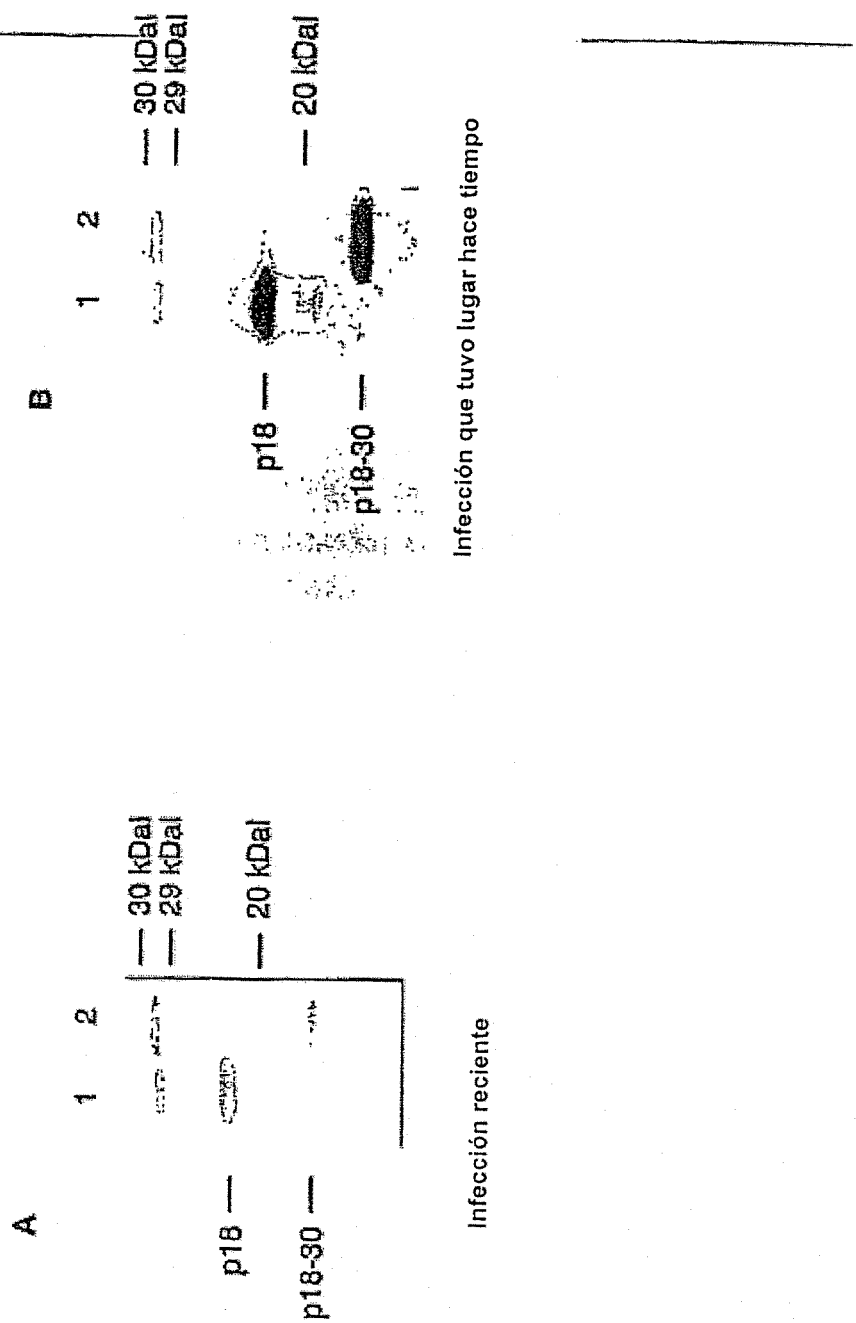
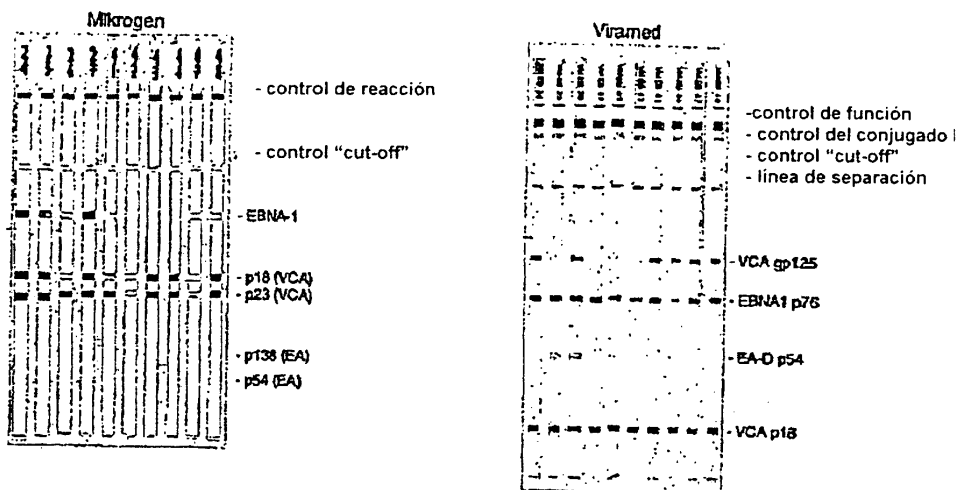


Figura 3



B: infección reciente

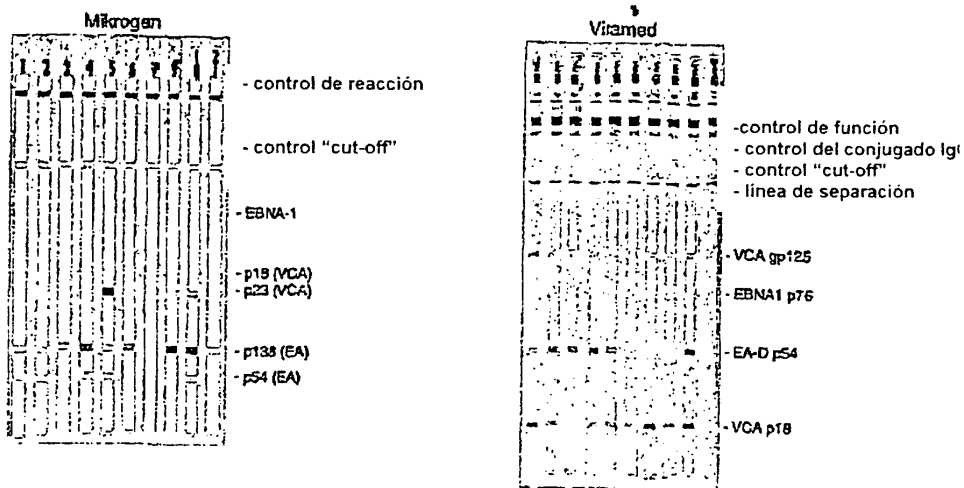
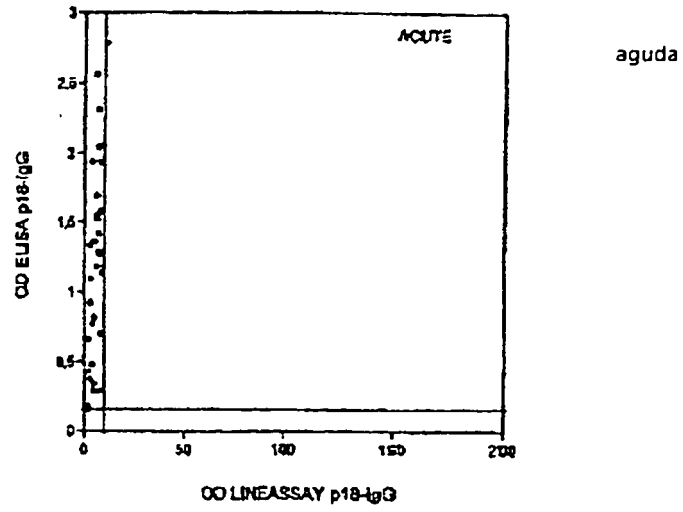


Figura 4: Comparación entre tiras Mikrogen/Viramed



B

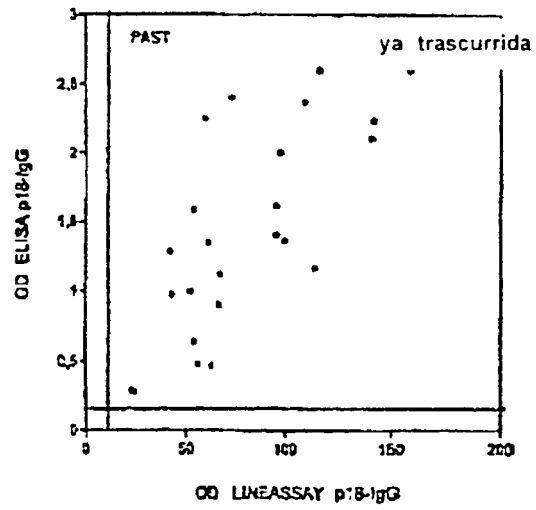
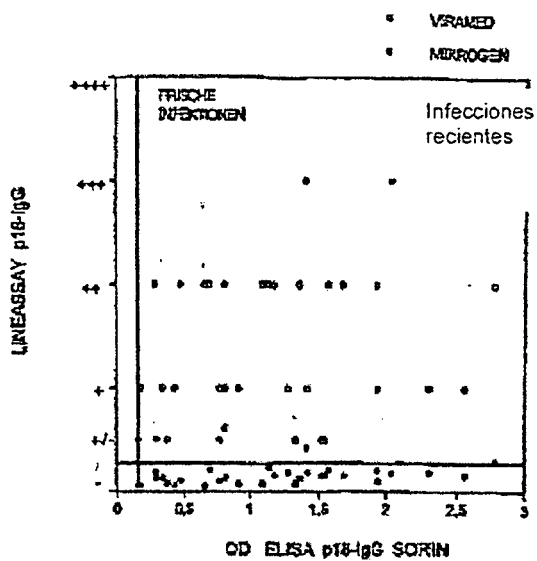
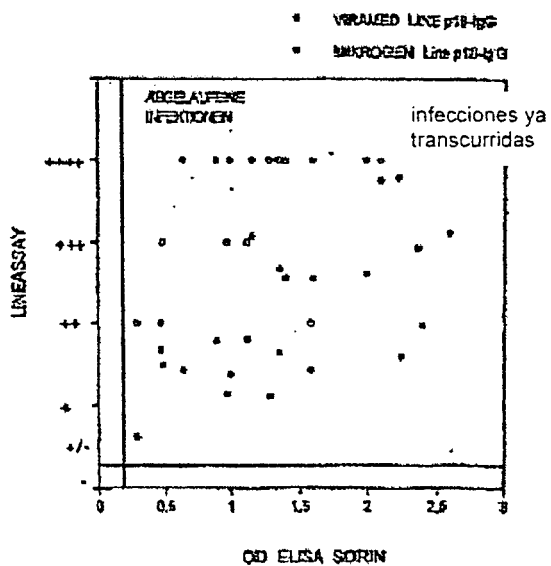


Figura 5



B



Nota: los peldaños intermedios en el ensayo de Microgen resultan de la medición con ayuda del procesador Blot Appollo. Sobre una curva de calibrado se correlacionó la OD obtenida por barrido con la evaluación semi-cuantitativa ++

Figura 6

Figura 7

1 MARRLEKPTL QGRLEADFPD SPLLPKFQEL NONNLPNDVF REAQRSYLVF LTSQFCYEEY
61 VQRTFGVPRR QRAIDKRQRA SVAGAGAHAA LGGSSATPVQ QAQAAASAGT GALASSAPST
121 AVAQSATPSV SSSISLRAA TSGATAAASA AAAVDTGSGG GGQPHDTAPR GARKKQ

ES 2 282 847 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MIKROGEN molekularbiologische Entwicklungs - GmbH

5 <120> Péptidos derivados de antígenos de la cápside del virus de Epstein-Barr y su utilización

<130> VCA modificado

10 <160> 6

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1

<211> 176

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 4

20

<400> 1

Met	Ala	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	Pro	Thr	Leu	Gln	Gly	Arg	Leu	Glu	Ala
1				5					10					15	
Asp	Phe	Pro	Asp	Ser	Pro	Leu	Leu	Pro	Lys	Phe	Gln	Glu	Leu	Asn	Gln
			20					25					30		
Asn	Asn	Leu	Pro	Asn	Asp	Val	Phe	Arg	Glu	Ala	Gln	Arg	Ser	Tyr	Leu
		35					40					45			
Val	Phe	Leu	Thr	Ser	Gln	Phe	Cys	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Val	Gln	Arg	Thr
	50					55					60				
Phe	Gly	Val	Pro	Arg	Arg	Gln	Arg	Ala	Ile	Asp	Lys	Arg	Gln	Arg	Ala
65					70					75					80
Ser	Val	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	His	Ala	His	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Ala
			85					90						95	
Thr	Pro	Val	Gln	Gln	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala
			100					105						110	
Leu	Ala	Ser	Ser	Ala	Pro	Ser	Thr	Ala	Val	Ala	Gln	Ser	Ala	Thr	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Thr	Ser	Gly	Ala
	130					135					140				
Thr	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Asp	Thr	Gly	Ser	Gly	Gly
145					150					155					160
Gly	Gly	Gln	Pro	His	Asp	Thr	Ala	Pro	Arg	Gly	Ala	Arg	Lys	Lys	Gln
				165					170					175	

ES 2 282 847 T3

<210> 2

<211> 146

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> p18 acortado en el N-terminal

10

<400> 2

15 Asn Gln Asn Asn Leu Pro Asn Asp Val Phe Arg Glu Ala Gln Arg Ser
1 5 10 15

20 Tyr Leu Val Phe Leu Thr Ser Gln Phe Cys Tyr Glu Glu Tyr Val Gln
20 25 30

25 Arg Thr Phe Gly Val Pro Arg Arg Gln Arg Ala Ile Asp Lys Arg Gln
35 40 45

30 Arg Ala Ser Val Ala Gly Ala Gly Ala His Ala His Leu Gly Gly Ser
50 55 60

35 Ser Ala Thr Pro Val Gln Gln Ala Gln Ala Ala Ala Ser Ala Gly Thr
65 70 75 80

40 Gly Ala Leu Ala Ser Ser Ala Pro Ser Thr Ala Val Ala Gln Ser Ala
85 90 95

45 Thr Pro Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser
100 105 110

50 Gly Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Val Asp Thr Gly Ser
115 120 125

55 Gly Gly Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg Lys
130 135 140

Lys Gln
175

55

<210> 3

<211> 39

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Cebador

ES 2 282 847 T3

<400> 3

gagggatcca tcatgaaacg cgggctgccc aagcccacc

5

<210> 4

<211> 33

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

15

<400> 4

cgctgcagt tactgtttct tacgtgcccc gcg

20

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

30

<400> 5

gagggatccc tgaaccagaa taatctcccc

35

<210> 6

<211> 33

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

45

<400> 6

cgctgcagt tactgtttct tacgtgcccc gcg

50

55

60

65