



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 325**

51 Int. Cl.:

C12N 15/38 (2006.01)

C12N 5/18 (2006.01)

C07K 14/05 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02075193 .9**

86 Fecha de presentación : **10.03.1993**

87 Número de publicación de la solicitud: **1225226**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.07.2002**

54

Título: **Péptidos y secuencias de ácido nucleico relacionadas con el virus Epstein Barr.**

30

Prioridad: **13.03.1992 EP 92200721**

73

Titular/es: **bioMerieux B.V.**
Boseind 15, P.O. Box 84
5280 AB Boxtel, NL

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

72

Inventor/es: **Middeldorp, J.M.**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 298 325 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 y secuencias de ácido nucleico relacionadas con el virus Epstein Barr.

5 La presente invención se refiere a péptidos inmunoquímicamente reactivos con anticuerpos para el virus Epstein Barr (EBV), secuencias de ácidos nucleicos que codifican estos péptidos, anticuerpos monoclonales contra estos péptidos, líneas celulares capaces de producir anticuerpos monoclonales y anticuerpos anti-idiotipo. La invención se refiere además a reactivos inmunológicos y a métodos para la detección de EBV o de anticuerpos anti-EBV.

10 EBV es un herpes virus humano ubicuo que se descubrió en primer lugar junto con la forma africana (endémica o e) del linfoma de Burkitt (BL). Posteriormente también se descubrió el virus asociado con el carcinoma nasofaríngeo (NPC) y demostró ser el agente causante de la mononucleosis infecciosa (IM). La infección se produce normalmente durante la infancia temprana, dando como resultado generalmente una manifestación subclínica, ocasionalmente con síntomas leves. La infección durante la adolescencia o la edad adulta, sin embargo, puede originar IM caracterizada por la presencia de linfocitos atípicos en la periferia. La mayoría de estos linfocitos son linfocitos T; sin embargo, estos incluyen una pequeña población de linfocitos B infectados por EBV. La infección de los linfocitos B también puede conseguirse *in vitro*. Dichas células se transforman y proliferan indefinidamente en cultivo y se han denominado "inmortalizadas", "infectadas de forma latente" o "con crecimiento transformado". Hasta donde se conoce, todos los individuos que se infectan con EBV permanecen infectados de forma latente durante toda su vida. Esto se refleja mediante la presencia continua durante toda la vida de pequeñas cantidades de células B transformadas positivas para el genoma de EBV entre los linfocitos que circulan en la sangre periférica y la difusión continua pero periódica de virus en la orofaringe.

25 En la gran mayoría de los casos la infección por EBV da como resultado una enfermedad linfoproliferativa que puede ser temporalmente debilitadora pero que siempre es benigna y autolimitante. Sin embargo en algunos individuos inmunosuprimidos, el resultado puede ser el desarrollo de un tumor. Esto se produce en individuos que están inmunosuprimidos de forma intencionada, particularmente niños que reciben trasplantes de órganos que están tratados con ciclosporina A o de forma oportunista, como en el caso de individuos infectados por VIH o genéticamente, como es el caso de machos afectados que tienen el gen XLP (síndrome proliferativo ligado al cromosoma X). En estos casos, los tumores resultantes se derivan de la proliferación policlonal de células B infectadas por EBV. Además en estos pacientes se puede detectar la replicación epitelial incontrolada del virus en lesiones de leucoplasia oral capilar. Por lo tanto, la respuesta inmune juega un papel principal en el control de la infección por EBV.

30 Como se ha mencionado anteriormente EBV es un miembro de los herpesvirus. Posee las siguientes propiedades estructurales:

- El genoma de EBV está constituido por una molécula de ADN de doble cadena lineal (173.000 pares de bases).
- El virión está constituido por un núcleo (proteínas y ADN), rodeado por una cápsida en forma de icosaedro y una envuelta de membrana que encierra a la cápsida. La cápsida en forma de icosaedro se construye a partir de capsómeros hexaméricos y pentaméricos. La envuelta de membrana está constituida por una membrana de bicapa de proteínas/lípidos con espículas en su superficie externa. El espacio entre la concha de la cápsida y la envuelta se rellena con proteína amorfa, denominada tegumento.
- Como todos los herpesvirus, EBV es capaz de establecer una infección latente durante toda la vida en su hospedador posteriormente a la infección primaria. Esta latencia representa un equilibrio perfecto entre EBV y su hospedador humano, controlado por el sistema inmune de los hospedadores.

50 Hasta hoy la mayor parte de los estudios bioquímicos y biológicos se han realizado sobre tres cepas prototipo de EBV, que son B95-8 (virus transformante producido en la línea celular marmoset), P3HR1 (virus no transformante producido por una línea celular tumoral del linfoma de Burkitt) y Raji (virus latente en una línea celular tumoral de linfoma de Burkitt).

55 Durante los últimos años, se ha determinado toda la secuencia del ADN de la cepa de virus prototipo B95-8. El análisis de esta secuencia ha dado como resultado la identificación de más de 80 marcos de lectura abiertos (Baer *et al.*, 1984, Nature 310, págs. 207-211). La biología del EBV plantea un problema especial a los investigadores debido a que sus características biológicas (infección latente) no se prestan al análisis de virus clásico. Además, su rango celular y de hospedadores está limitado eficazmente a linfocitos B y células epiteliales de ser humano (y a las de unos pocos primates superiores) que generalmente no posibilitan un cultivo *in vitro*. Además, la ausencia de un tipo celular totalmente permisivo, uno en el que el virus se replica de forma lítica, ha limitado enormemente la capacidad para producir grandes cantidades del virus.

65 Las moléculas de ADN de aislados de B95-8, P3HR1 y Raji han sido los prototipos para el mapeado detallado de endonucleasa de restricción y para clonar en plásmidos de *Escherichia coli* (*E. coli*) y en el bacteriófago lambda y para la secuenciación de nucleótidos.

El genoma de EBV está constituido por una única molécula de ADN de doble cadena construida con elementos de ADN únicos y repetidos en tandem. Cada extremo de la molécula de ADN contiene múltiples secuencias terminales

ES 2 298 325 T3

que permiten la unión de forma covalente y la circularización del genoma. En partículas de virus el genoma de EBV solamente es detectable en forma lineal. Por el contrario, existe como episoma circular en el interior del núcleo de células infectadas de forma latente.

5 Las secuencias de repetición interna IR1 a IR4, separan el genoma de EBV en cinco regiones únicas. Las regiones U2 y U3 varían enormemente entre diferentes aislados de EBV, estando el primero casi completamente deletado en la cepa P3RH-1 de EBV.

10 La nomenclatura de los marcos de lectura de EBV se basa en su posición en el genoma del virus. Los nombres comienzan con las iniciales del fragmento de restricción BamH1 o EcoR1 donde comienza la expresión. La tercera letra del nombre es L o R, dependiendo de si la expresión es hacia la izquierda o hacia la derecha en el mapa convencional (de este modo BLLF2 es el segundo marco de lectura hacia la izquierda que se inicia en el fragmento de restricción L de BamH1).

15 La clasificación serológica de los antígenos del virus en el ciclo de producción de EBV se basa en diferentes técnicas de fluorescencia.

20 Los antígenos detectados de forma específica por medio de la técnica de inmunofluorescencia anti-complemento en el núcleo de células B infectadas de forma latente fijadas (por ejemplo, células Raji) se clasifican como antígenos nucleares de Epstein Barr (EBNA). Después de la activación de la expresión génica viral mediante factores químicos o virales se detecta una clase de antígenos tempranos (EA) cuya síntesis no se bloquea mediante la inhibición de la síntesis del ADN viral. Dependiendo del tipo de fijador usado (Metanol o Acetona) son detectables dos conjuntos distintos de EA, EA_R y EA_D. EA es detectable mediante inmunofluorescencia indirecta en el citoplasma y en el núcleo de células inducidas. Después del inicio de la síntesis del ADN viral (y dependiendo de ésta) se sintetizan proteínas
25 estructurales del virus (VCA) que son detectables mediante inmunofluorescencia indirecta en el citoplasma y en el núcleo de células productoras del virus (por ejemplo, células P₃HR₁). En la superficie de células infectadas viables, inducidas para la producción de virus es detectable un conjunto de antígenos (MA) mediante inmunofluorescencia indirecta. Estos antígenos también pueden encontrarse en la envuelta viral y son dianas importantes para la neutralización del virus. La detección de anticuerpos específicos para EBV en sueros humanos puede realizarse de forma rutinaria
30 mediante técnicas serológicas de acuerdo con lo descrito por Menke y Henle (Human Pathology, 5, 551-565, 1974).

En base a los datos bioquímicos y de inmunofluorescencia es posible distinguir cinco clases diferentes de moléculas de antígeno. Los diferentes polipéptidos virales se designan mediante su peso molecular y no se ha establecido una nomenclatura común excepto para las proteínas de la envuelta del virus. Los cinco grupos diferentes de antígenos son:

35 A. El grupo de antígenos que se expresan durante un estado de latencia (EBNA y LMP).

40 B. El grupo de antígenos que son responsables de la activación del genoma y de la inducción inicial de la replicación viral (IEA).

C. El grupo de antígenos que se inducen mediante productos del gen IEA y que se requieren para la replicación del ADN viral; estos antígenos son en su mayor parte enzimas virales (EA).

45 D. El grupo de antígenos que son componentes estructurales de la partícula viral y que se expresan de forma tardía en el ciclo de replicación viral (VCA) después del inicio de la síntesis del ADN viral.

E. El grupo de antígenos que se expresan en la membrana celular de la célula infectada (MA).

Antígenos de la cápsida viral (VCA) de EBV

50 Para este complejo de antígenos también preocupa que la comparación de proteínas específicas de EBV identificadas en diferentes estudios es difícil debido a las variaciones en los sistemas de gel de poliacrilamida, líneas celulares e inductores químicos usados y los sueros empleados.

55 Dolyniuk *et al.* (1979) describieron un total de 33 proteínas asociadas con viriones purificados. La solubilización diferencial con detergentes sugiere que la nucleocápsida está constituida por al menos siete proteínas. Un componente importante del complejo VCA es la proteína principal de la cápsida (MCP). La MCP de EBV está codificada dentro del marco de lectura BcLF1 del genoma viral (Bear *et al.*, 1984) y se expresa como una proteína no glicosilada de 153-160 kDa en líneas celulares productoras de EBV con un pI de 7,5 a 9,0. Esta proteína se sintetiza en el
60 citoplasma en forma soluble y después se transporta al núcleo, donde se condensa en cápsidas y ya no se solubiliza mediante detergentes. Otro componente de VCA principal tiene un peso molecular de 125 kDa y está glicosilado. Esta proteína está codificada dentro del marco de lectura BALF4 del genoma viral. Aunque esta glicoproteína se clasificó originariamente como un componente de VCA, recientes descubrimientos indican que en realidad puede estar asociada con estructuras citoplásmicas y de la membrana nuclear.

65 Los experimentos descritos anteriormente (J.M. Middeldorp y P. Herbrink, J. Virol. Meth., 21, 133-146, 1988) pretendían la identificación y caracterización de proteínas marcadoras de EBV relevantes para el diagnóstico con respecto a diferentes enfermedades por EBV.

Esto se realizó usando tiras de inmunotransferencia que contenían antígenos preparados a partir de la línea celular productora del virus HH514-C16 (un derivado superinducible de P3HR1), inducidas para la expresión de VCA/EA o EA y a partir de las líneas celulares negativas para EBV Ramos y Bjab. Pueden usarse líneas celulares que tienen el genoma de EBV en un estado (completamente) latente, X50-7 y JC-5, para el estudio de EBNA/LMP específicamente.

Los patrones de respuesta de anticuerpos para EBV se estudiaron en sueros de donantes de sangre seropositivos sanos, en sueros de pacientes de IM y pacientes de IM crónicos o pacientes con tumores asociados con EBV tales como carcinoma nasofaríngeo. Pueden usarse anticuerpos policlonales y monoclonales reactivos con productos del genoma de EBV definidos para caracterizar algunas de las bandas de proteína detectadas en este sistema experimental. Sin embargo, estos estudios describían solamente proteínas o polipéptidos con cierto peso molecular. No estaba disponible información como la secuencia codificante en el genoma de EBV para estas proteínas. Tampoco se sabía si las bandas inmunorreactivas en las inmunotransferencias se debían a la reactividad con proteínas sencillas o múltiples del mismo peso molecular.

Con la técnica de inmunotransferencia es posible detectar un antígeno de EBV con un peso molecular de 18 kDa. Esta proteína no se expresa cuando se usa ácido fosfonoacético (PAA) para bloquear la síntesis de ADN viral y se detecta mediante todos los sueros que contienen anticuerpos anti-VCA, lo que indica que es un componente relacionado con VCA. Otro componente de VCA es una proteína con un peso molecular de 40 kDa. Muchos de los antígenos de la cápsida viral se asocian con el sedimento nuclear.

Actualmente el serodiagnóstico específico de EBV se realiza mediante ensayos de inmunofluorescencia bastante subjetivos. El avance hasta diagnósticos más sencillos y uniformes (por ejemplo, ELISA) se dificulta ya que no es posible la producción en masa y la purificación de antígenos virales usando líneas celulares productoras de virus convencionales. La única manera de conseguir esto podría ser usar antígeno(s) de EBV preparado(s) de forma alternativa. Estos antígenos de EBV podrían prepararse con técnicas de ingeniería genética o con técnicas de síntesis de péptidos.

Para el desarrollo de un método específico y sensible para permitir un diagnóstico fiable a realizar en diversas fases de la infección con EBV, es de gran importancia identificar proteínas virales inmunodominantes y epítomos de las mismas.

La presente invención proporciona péptidos que comprenden al menos parte de la proteína VCA-p40, codificada dentro del marco de lectura abierto de EBV BdRF1 y fragmentos de la misma, inmunoquímicamente reactivos con anticuerpos para el virus Epstein Barr. Parte de la invención son por lo tanto péptidos con 345 aminoácidos y una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID N°: 4 que son inmunoquímicamente reactivos con anticuerpos contra EBV.

Se ha descubierto que los péptidos de acuerdo con la invención son particularmente adecuados para su uso en un método de diagnóstico para la determinación de la presencia de EBV o anticuerpos contra EBV en una muestra. Además, un péptido de acuerdo con la invención puede usarse en formas de dosificación farmacéuticamente adecuadas en el tratamiento de una enfermedad relacionada con EBV. La preparación de vacunas obtenidas de este modo que contienen un péptido o un fragmento del mismo como ingredientes activos, la conoce un especialista en la técnica.

Al contrario que el EBV natural, los péptidos de acuerdo con la invención tienen la gran ventaja de ser de origen seguro y no infeccioso.

La invención comprende también fragmentos de dichos péptidos que siguen siendo inmunoquímicamente reactivos con anticuerpos para el virus Epstein Barr.

El término "péptido" como se usa en este documento se refiere a una cadena molecular de aminoácidos con actividad biológica y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto se incluyen, entre otros, proteínas, proteínas de fusión o péptidos de fusión, oligopéptidos y polipéptidos. Si fuera necesario, los péptidos de acuerdo con la invención pueden modificarse *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo mediante glicosilación, amidación, carboxilación o fosforilación. Las variantes funcionales como, por ejemplo, sales de adición de ácidos, amidas, ésteres y específicamente ésteres C-terminales y derivados de N-acilo de los péptidos de acuerdo con la invención, también se consideran por lo tanto, parte de la presente invención. Se entenderá que para las proteínas o polipéptidos particulares abarcados en este documento, también pueden existir variaciones naturales. Estas variaciones pueden demostrarse mediante (una) diferencia(s) en aminoácido(s) en la secuencia global o mediante deleciones, sustituciones, inserciones, inversiones o adiciones de (un) aminoácido(s) en dicha secuencia. Se han descrito las sustituciones de aminoácidos de las que puede esperarse que no alteren esencialmente las actividades biológicas e inmunológicas. Las sustituciones de aminoácidos entre aminoácidos relacionados o sustituciones que se han producido frecuentemente en la evolución son, entre otras Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (véase Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Bio-med. Res. Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, supl. 3). En base a esta información Lipman y Pearson desarrollaron un método para la comparación de proteínas rápida y sensible (Science 227, 1435-1441, 1985) y para determinar la similitud funcional entre proteínas homólogas.

El término "fragmento" como se usa en este documento significa una secuencia de aminoácidos que comprende una subsecuencia de un péptido de la invención. Dicho fragmento es un péptido que tiene uno o más determinantes inmunogénicos de la proteína VCA-p40. Los fragmentos pueden producirse, entre otros, mediante escisión enzimática

ES 2 298 325 T3

de moléculas precursoras, usando endonucleasas de restricción para el ADN y proteasas para los polipéptidos. Otros métodos incluyen síntesis química de los fragmentos o la expresión de fragmentos del péptido mediante fragmentos de ADN.

5 Los fragmentos inmunogénicos adecuados de un péptido de acuerdo con esta invención que contienen (un) epítipo(s) pueden encontrarse por medio del método descrito en la solicitud de patente WO 86/0648, Geysen, H.M. *et al* (Proc Natl. Acad. Sci. 81, 3998-4002, 1984), Geysen, H.M. *et al*. (J. Immunol. Meth. 102, 259-274, 1987) en base al denominado método pepsan, en el que se sintetiza una serie de péptidos que se solapan parcialmente que corresponden a secuencias parciales del polipéptido completo en cuestión y se investiga su reactividad con anticuerpos.

10 Además, pueden designarse varias regiones de los péptidos como epítipos en base a consideraciones teóricas, aunque el valor predictivo de estas consideraciones teóricas está limitado. La determinación de estas regiones se basa en la combinación de los criterios de hidrofilia de acuerdo con Hopp y Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 3824-3828, 1981) y de aspectos de la estructura secundaria de acuerdo con Chou y Fasman (Advances in Enzymology 47, 45-148, 1987).

15 Los péptidos preferidos de acuerdo con la invención son péptidos que comprenden al menos una de las secuencias de aminoácidos que se muestran en la SEC ID N° 5 y en la SEC ID N° 6.

20 El más preferido es un péptido que comprende el aminoácido que se muestra en la SEC ID N° 5 unido a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 6. Dicho péptido de combinación ha demostrado ser extremadamente útil para la detección específica de anticuerpos IgG, IgA, IgM para EBV-VCA, con una sensibilidad similar o incluso mejor que las técnicas serológicas convencionales. Como tal, IgM-EBV es un marcador de diagnóstico útil para la infección primaria aguda de EBV, mientras que IgA para EBV es útil para el diagnóstico y el pronóstico en carcinoma nasofaríngeo. EBV-IgG es positivo en todos los portadores humanos de EBV y negativo en personas no infectadas por el virus. Además, los cambios en el título de anticuerpos para cada uno de los anticuerpos de una subclase específica pueden tener un valor de diagnóstico adicional. Puesto que los anticuerpos de diferentes subclases tienen un valor de diagnóstico específico en diferentes etapas de la infección por EBV, el uso de un péptido de combinación de acuerdo con la invención en ensayos de diagnóstico, por ejemplo ELISA, puede ser una gran ventaja.

30 La preparación de los péptidos o fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención se realiza por medio de uno de los métodos de química orgánica conocidos para la síntesis de péptidos o con la ayuda de técnicas de ADN recombinante.

35 Se considera que los métodos de química orgánica para la síntesis de péptidos incluyen el acoplamiento de los aminoácidos requeridos por medio de una reacción de condensación, en una fase homogénea o con ayuda de una denominada fase sólida.

La reacción de condensación puede realizarse de la siguiente manera:

- 40
- a) condensación de un compuesto (aminoácido, péptido) con un grupo carboxilo libre y protegido frente a otros grupos reactivos con un compuesto (aminoácido, péptido) con un grupo amino libre y protegido frente a otros grupos reactivos, en presencia de un agente de condensación;
 - 45 b) condensación de un compuesto (aminoácido, péptido) con un grupo carboxilo activado y libre o protegido frente a otros grupos de reacción con un compuesto (aminoácido, péptido) con un grupo amino libre y libre o protegido frente a otros grupos reactivos.

50 La activación del grupo carboxilo puede tener lugar, entre otros, convirtiendo el grupo carboxilo en un haluro de ácido, azida, anhídrido, imidazoluro o éster activado, tal como N-hidroxi-succinimida, N-hidroxi-benzotriazol o éster de p-nitrofenilo.

55 Los métodos más comunes para las reacciones de condensación anteriores son: el método de carbodiimida, el método de azida, el método de anhídrido mezclado y el método que usa ésteres activados, tal como se describe en el documento *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology* Vol. 1-3 (Ed, Gross, E. y Meienhofer, J.) 1979, 1980, 1981 (Academic Press, Inc.).

60 La preparación de fragmentos adecuados de los péptidos mencionados anteriormente de acuerdo con la invención usando la "fase sólida" se describe por ejemplo en el documento *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2149 (1963) y en *Int. J. Peptide Protein Res.* 35, 161-214 (1990). El acoplamiento de los aminoácidos del péptido a preparar comienza normalmente a partir del extremo carboxilo. Para este método se necesita una fase sólida en la que haya grupos reactivos o en la que puedan introducirse dichos grupos. Esto puede ser, por ejemplo, un copolímero de benceno y divinilbenceno con grupos clorometilo reactivos o una fase sólida polimérica que se hace reactiva con una función hidroximetilo o amina.

65 Una fase sólida particularmente adecuada es por ejemplo, la resina de alcohol p-alcoixibencílico (resina de 4-hidroxi-metil-fenoxi-metil- copoliestireno/divinilbenceno al 1%), descrita por Wang (1974) *J. Am. Chem. Soc.* 95, 1328. Después de la síntesis los péptidos pueden separarse de esta fase sólida en condiciones moderadas.

ES 2 298 325 T3

Después de la síntesis de la secuencia de aminoácidos deseada, sigue la separación del péptido de la resina, por ejemplo, con ácido trifluorometanosulfónico o con ácido metanosulfónico disuelto en ácido trifluoroacético. El péptido también puede retirarse del vehículo mediante transesterificación con un alcohol inferior, preferiblemente metanol o etanol, en cuyo caso se forma directamente un alquiléster inferior del péptido. Del mismo modo, la separación con ayuda de amoníaco da una amida de un péptido de acuerdo con la invención.

Los grupos reactivos que pueden no participar en la reacción de condensación están, como se ha indicado, protegidos eficazmente mediante grupos que pueden retirarse de nuevo muy fácilmente mediante hidrólisis con ayuda de ácidos, bases o mediante reducción. Por lo tanto, un grupo carboxilo puede protegerse eficazmente mediante por ejemplo esterificación con metanol, etanol, butanol terciario, alcohol bencílico o alcohol p-nitrobencílico y aminas unidas al soporte sólido.

Los grupos que pueden proteger eficazmente a un grupo amino son el grupo etoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, t-butoxicarbonilo (t-boc) o p-metoxi-benciloxicarbonilo o un grupo ácido obtenido de un ácido sulfónico, tal como bencenosulfonilo o el grupo p-toluenosulfonilo, pero también pueden usarse otros grupos, tales como grupos arilo o aralquilo sustituidos o no sustituidos, por ejemplo bencilo o trifenilmetilo o grupos tales como orto-nitrofenil-sulfenilo 2-benzoil-1-metil-vinilo. Un grupo α -amino-protector particularmente adecuado es por ejemplo el grupo 9-fluorenil-metoxicarbonilo sensible a bases (Fmoc) [Carpino & Han (1970) J. Amer. Chem. Soc. 92, 5748].

Un informe más exhaustivo de grupos protectores posibles puede encontrarse en el documento The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1-9 (Eds. Gross, Udenfriend y Meienhofer) 1979-1987 (Academic Press, Inc.).

Es necesario además proteger el grupo ϵ -amino de la lisina y es recomendable para el grupo guanidina de arginina. Grupos protectores habituales a este respecto son un grupo Boc para lisina y un grupo Pmc- o Pms- o Mbs o Mtr- para arginina.

Los grupos protectores pueden separarse mediante diversos métodos convencionales, dependiendo de la naturaleza del grupo particular, por ejemplo con ayuda de ácido trifluoroacético o mediante reducción moderada, por ejemplo mediante hidrógeno y un catalizador, tal como paladio o con HBr en ácido acético glacial.

Como se ha indicado anteriormente, los péptidos de acuerdo con la invención pueden prepararse del mismo modo con ayuda de técnicas de ADN recombinante. Esta posibilidad es importante particularmente cuando el péptido se incorpora en una secuencia de repetición ("en tandem") o cuando el péptido puede prepararse como constituyente de una proteína o polipéptido (mucho mayor) o como una proteína de fusión con por ejemplo, (parte de) β -galactosidasa. Este tipo de péptidos por lo tanto están del mismo modo dentro del alcance de la invención. Para este fin, como constituyente de un ADN recombinante, se usa una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la invención y que, además, está sustancialmente libre de segmentos de ácido nucleico, que en el genoma de EBV de origen natural flanquean a la secuencia de ácido nucleico indicada anteriormente.

Este último método implica la preparación del péptido deseado por medio de la expresión de un polinucleótido recombinante con una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más de los péptidos en cuestión en un microorganismo adecuado como hospedador.

La invención por lo tanto describe además secuencias de ácido nucleico que codifican un péptido de acuerdo con la invención, preferiblemente que comprenden al menos parte de la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEC ID N° 1 y/o 3.

"Secuencia de ácido nucleico" como se usa en este documento se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto secuencias de ácido ribonucleico como secuencias de ácido desoxirribonucleico. En principio, esta expresión se refiere a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, esta expresión incluye ADN de cadena doble y sencilla así como ARN de cadena doble y sencilla y modificaciones de los mismos.

Una secuencia de ácido nucleico puede ligarse a diversas secuencias efectoras de la replicación de ADN con las que no se asocia o une en la naturaleza, dando como resultado una denominada molécula de vector recombinante que puede usarse para la transformación o la transfección de un hospedador adecuado. Las moléculas vectores recombinantes útiles, se obtienen preferiblemente a partir de, por ejemplo, plásmidos, bacteriófagos, cósmidos o virus. Los vectores específicos o vehículos de clonación que pueden usarse para clonar secuencias de ácido nucleico, se conocen en la técnica e incluyen, entre otros, vectores plasmídicos tales como pBR322, los diversos plásmidos pUC, pGEM y Bluescript, bacteriófagos, por ejemplo kgt-Wes, Charon 28 y fagos obtenidos de M13 o vectores virales tales como SV40, adenovirus o virus del polio (véase también Rodríguez R.L y D.T. Denhardt, ed., Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Butterworths, 1988; Lenstra, J.A. *et al.*, Arch. Virol. 110, 1-24, 1990). Los métodos a usar para la construcción de una molécula de vector recombinante los conocen los especialistas en la técnica y se muestran entre otros en Maniatis, T. *et al.* (Molecular Cloning A Laboratory Manual, segunda edición; Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Por ejemplo, la inserción de la secuencia de ácido nucleico en un vector de clonación puede conseguirse fácilmente cuando los genes y el vehículo de clonación deseado se han cortado con la(s) misma(s) enzima(s) de restricción con lo que se producen extremos de ADN complementarios.

ES 2 298 325 T3

Las moléculas de vector recombinante pueden contener además una o más actividades marcadoras que pueden usarse para seleccionar transformantes deseados, tales como resistencia a ampicilina y a tetraciclina en pBR322, como por ejemplo resistencia a ampicilina y péptido α de β -galactosidasa en pUC8.

5 La invención también describe (una) célula(s) hospedadora(s) transformada(s) o transfectada(s) con una secuencia de ácido nucleico o una molécula de vector de expresión recombinante descrito anteriormente, capaces de producir los péptidos de acuerdo con la invención mediante la expresión de la secuencia de ácido nucleico correspondiente. Una célula hospedadora adecuada es un microorganismo o célula que puede transformarse mediante una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido o mediante una molécula de vector recombinante que comprende dicha secuencia de
10 ácido nucleico y que puede usarse, si se desea, para expresar dicho péptido codificado por dicha secuencia de ácido nucleico. La célula hospedadora puede ser de origen procarionta, por ejemplo bacteriano tal como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y especies de *Pseudomonas*; o de origen eucariota tal como levaduras, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* o células de eucariotas superiores tales como células de insecto, de vegetales o de mamíferos, incluyendo células HeLa y células de Ovario de Hámster Chino (CHO). En general, se prefieren procariontas para la construcción
15 de las moléculas de vector recombinante útiles en la invención. Para la expresión se introducen secuencias de ácido nucleico en un vector de expresión, es decir, dichas secuencias se unen de forma operativa a secuencias de control de la expresión. Dichas secuencias de control pueden comprender promotores, potenciadores, operadores, inductores, sitios de unión al ribosoma, etc. Por lo tanto, la presente invención describe una molécula de vector recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos identificados anteriormente unida de forma
20 operativa a secuencias de control de la expresión, capaces de expresar las secuencias de ADN contenidas en su interior en (una) célula(s) hospedadora(s) transformada(s) o transfectada(s).

Debe entenderse por supuesto que las secuencias de nucleótidos insertadas en el sitio seleccionado del vector de clonación pueden incluir solamente un fragmento de la secuencia de ácido nucleico completa que codifica los péptidos
25 de acuerdo con la invención, siempre que el hospedador transformado o transfectado produzca un polipéptido que tenga al menos uno o más determinantes inmunogénicos.

Los anticuerpos, dirigidos contra un péptido de acuerdo con la invención también forman parte de la presente invención. Los péptidos o fragmentos de los mismos preparados y descritos anteriormente se usan para producir anti-
30 cuerpos, tanto policlonales como monoclonales. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra péptidos de acuerdo con la invención puede producirlos fácilmente un especialista en la técnica.

Los anticuerpos preferidos contra un epítipo de la proteína VCA-p40 son anticuerpos que tienen la misma reactividad con VCA-p40 que los anticuerpos producidos mediante la línea celular de hibridoma ratón-ratón depositada
35 en la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) (Colección Europea de Cultivos de Células Animales), Porton Down (UK), con el número de depósito provisional 93020414.

Las líneas celulares inmortalizadas capaces de excretar anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención también forman parte de la presente invención.
40

La preparación de líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales puede producirse mediante, por ejemplo, la técnica de Kohler y Milstein (Kohler y Milstein diseñaron técnicas que dieron como resultado la formación de
45 hibridomas que producen anticuerpos monoclonales (G. Kohler y C. Milstein, 1975, Nature 256: 495-497; 1976, Eur. J. Immunol. 6: 511-519)), transformación con virus Epstein-Barr o una técnica de transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico o una fusión directa de linfocitos B humanos con un compañero de fusión que sea una línea celular de mieloma humana o híbrida de ratón-ser humano o una fusión directa de una línea de células B transformada con EBV con dichas líneas celulares de mieloma.

Las líneas celulares preferidas de acuerdo con la invención son las líneas celulares depositadas en la European
50 Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down (UK) con el número de depósito 93020414. Estas líneas celulares de han depositado en la ECACC el 4 de febrero de 1993, bajo los términos y condiciones del tratado de Budapest de 1977.

La línea celular con el número de depósito provisional 93020414 es capaz de producir anticuerpos contra un
55 epítipo de la proteína VCA-p40 y es una línea celular de hibridoma de ratón-ratón. Los anticuerpos producidos por estas líneas celulares se han usado para identificar epítipos en la proteína (como se ejemplifica adicionalmente en los ejemplos).

Los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, dirigidos contra péptidos de acuerdo con la invención son
60 muy adecuados para el diagnóstico y la inmunquímica para la detección *in situ* en muestras de tejido, mientras que los anticuerpos que son neutralizantes son muy útiles para inmunoterapia pasiva. Pueden usarse especialmente anticuerpos monoclonales para generar anticuerpos anti-idiotipo. Las técnicas para generar anticuerpos anti-idiotipos se conocen en la técnica. Los anticuerpos anti-idiotipo reactivos con anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención, como se han descrito anteriormente, forman parte de la presente invención.
65

Los anticuerpos anti-idiotipo son anticuerpos dirigidos contra la parte variable de inmunoglobulinas. Una subpoblación de anticuerpos anti-idiotipo se conoce como "anti-idiotipo β " o "imágenes internas". Estos anticuerpos anti-idiotipo β tienen una semejanza estructural o tridimensional con el antígeno (Uytdehaag, F.G.C.M. *et al.* Immunol.

ES 2 298 325 T3

Rev; 92; 93-113; 1986). Este tipo de anticuerpos anti-idiotipo se usa ampliamente como vacuna contra enfermedades infecciosas en modelos animales (Hiernaux J.R. *M Infect. Immun.*; 56; 1407-1413; 1988, Kennedy, R.C. *et al.*; *Science* 232; 220-223; 1986). Para su uso en ensayos los anticuerpos anti-idiotipo pueden generarse en grandes cantidades.

5 Las técnicas para generar anticuerpos anti-idiotipo se conocen en la técnica. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos anti-idiotipo de acuerdo con la invención inmunizando ratones BALB/c con anticuerpos monoclonales, acoplados a KLH con glutaraldehído de acuerdo con procedimientos convencionales de la bibliografía, mezclados con adyuvante completo de Freund. Las células esplénicas de estos ratones pueden immortalizarse y los hibridomas obtenidos de este modo pueden seleccionarse para la producción de anticuerpos anti-idiotipo. La selección de los hibridomas puede realizarse, por ejemplo, uniendo anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención a una fase sólida (pocillos de placas de microtitulación) e incubando la fase sólida con sobrenadante del cultivo de hibridomas en crecimiento. Puede añadirse un péptido de EBV acoplado con Peroxidasa de Rábano Rusticano (HRP). La presencia de anticuerpos anti-idiotipo en el sobrenadante del cultivo se indicará a continuación mediante la inhibición de la unión de este conjugado de péptidos a los anticuerpos monoclonales extendidos sobre la fase sólida.

15 Los anticuerpos anti-idiotipo pueden usarse por ejemplo para la inhibición de la unión de antígenos de EBV humanos y/o animales en un inmunoensayo usando anticuerpos contra EBV. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos anti-idiotipo como agente imitador del reactivo inmunoquímico que se menciona a continuación en este documento. Dichos anticuerpos anti-idiotipo también son útiles para el diagnóstico y tratamiento de EBV, así como para la identificación de regiones epitópicas importantes de antígenos de EBV.

Un reactivo inmunoquímico que comprende uno o más péptidos o anticuerpos de acuerdo con la invención también forma parte de la presente invención.

25 La expresión “reactivo inmunoquímico” de acuerdo con la invención está constituida normalmente por uno o más péptidos de acuerdo con la invención y un soporte o una sustancia marcadora adecuada.

Los soportes que pueden usarse son, por ejemplo, la pared interna de un pocillo o una cubeta de microensayo, un tubo o capilar, una membrana, filtro, tira reactiva o la superficie de una partícula tal como por ejemplo una partícula de látex, un eritrocito, un colorante coloidal, un coloide metálico o un compuesto metálico tal como una partícula coloidal, una proteína vehículo tal como BSA o KLH. Las sustancias marcadoras que pueden usarse son entre otras un isótopo radioactivo, un compuesto fluorescente, una enzima, un colorante coloidal, un coloide metálico o un compuesto metálico como partícula coloidal. En un método para la detección de anticuerpos dirigidos contra EBV en una muestra, se pone en contacto un reactivo inmunoquímico de acuerdo con la invención con la muestra. Después de lo cual, se detecta la presencia de complejos inmunes formados entre el péptido y los anticuerpos en la muestra y mediante esta detección se conoce la presencia de anticuerpos contra EBV en la muestra y puede determinarse cuantitativamente.

35 Dependiendo de la naturaleza y de características adicionales del reactivo inmunoquímico la reacción inmunoquímica que tiene lugar es una denominada reacción de sándwich, una reacción de aglutinación, una reacción competitiva o una reacción de inhibición.

Para la detección de EBV en una muestra puede ponerse en contacto un reactivo inmunoquímico de acuerdo con la invención, que contiene uno o más péptidos de acuerdo con la invención, con la muestra y con el anticuerpo anti-EBV después de lo cual puede detectarse la presencia de complejos inmunes formados y, a partir de esto, puede determinarse la presencia de EBV en una muestra.

Un método particularmente adecuado para la detección de EBV en una muestra se basa en una reacción competitiva entre un péptido de acuerdo con la invención equipado con una sustancia marcadora y un antígeno de EBV (presente en la muestra) con lo que el péptido y el antígeno compiten con el anticuerpo dirigido contra EBV unido a un soporte sólido.

La invención también comprende un método para la detección de un virus Epstein-Barr en una muestra, caracterizado porque un anticuerpo de acuerdo con la invención se pone en contacto con una muestra y después se detecta la presencia de complejos inmunes formados, lo que es una medida de la presencia del virus Epstein-Barr en la muestra.

55 Un kit de ensayo de acuerdo con la invención comprende como constituyente esencial un reactivo inmunoquímico como se ha descrito anteriormente. Para realizar una reacción de sándwich, para la detección de anticuerpos contra EBV, el kit de ensayo puede comprender, por ejemplo, el péptido de acuerdo con la invención extendido sobre un soporte sólido, por ejemplo la pared interna de un pocillo de microensayo y un péptido marcado de acuerdo con la invención o un anti-anticuerpo marcado.

Para realizar una reacción competitiva, el kit de ensayo puede comprender un péptido de acuerdo con la invención, extendido sobre un soporte sólido y un anticuerpo marcado dirigido contra EBV, preferiblemente un anticuerpo monoclonal dirigido contra dicho péptido.

65 En una reacción de aglutinación, el kit de ensayo comprende un reactivo inmunoquímico que puede comprender un péptido de acuerdo con la invención extendido sobre partículas o coloides. Otra realización de un kit de ensayo es, por ejemplo, el uso de un péptido marcado de acuerdo con la invención como reactivo inmunoquímico en una

ES 2 298 325 T3

reacción competitiva con un antígeno de EBV a detectar por un sitio de unión del anticuerpo dirigido contra EBV, que se extiende sobre un soporte sólido.

5 La nueva secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC ID N° 3 puede usarse como base para un ensayo para detectar ADN o ARN de EBV mediante una técnica de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), como se describe por ejemplo en los documentos EP 201.814 y EP 329.822, respectivamente. También se describe un método para la amplificación y detección de una secuencia de ácido nucleico del virus Epstein-Barr en una muestra usando al menos una secuencia de ácido nucleico o un fragmento de la misma de acuerdo con el (los) cebador(es) de la invención para realizar una amplificación de ácido nucleico de dicho ácido nucleico del virus Epstein-Barr y para detectar la secuencia amplificada.

15 La invención se ejemplifica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, en los que la referencia a VCA-p18 y BFRF3 tiene fines comparativos.

Leyendas

20 Figura 1: Representa el enfoque usado para identificar los genes codificados en EBV que codifican las proteínas VCA-p40 y VCA-p18.

Figura 2

25 a) Transferencia de Western de un extracto de antígeno nuclear de la línea celular productora de virus HH514, inducida para la expresión de EA y VCA.

b) Transferencia de Western del lisado de células completas de *E. coli* que expresan la proteína de fusión BFRF3- β -galactosidasa.

30 c) Transferencia de Western del lisado de células completas de *E. coli* que expresan la proteína de fusión BDRF1- β -galactosidasa.

d) Transferencia de Western del lisado de células completas de *E. coli* que expresan solamente β -galactosidasa.

35 Las transferencias se sondearon con un conjunto de sueros individuales. Los sueros usados en las bandas 1-16 de las transferencias eran respectivamente:

1. anticuerpo monoclonal de ratón contra β -Gal (Promega)
- 40 2. anticuerpo monoclonal de ratón contra VCA-P40 generado mediante inmunización con proteínas naturales de la cápsida viral (EBV.OT41A).
3. anticuerpo humano monoespecífico contra VCA-P18 viral obtenido mediante purificación por inmunoafinidad específica con VCA-P18 viral.
- 45 4-5. sueros humanos seronegativos para EBV.
- 6-16. sueros humanos seropositivos para EBV con una reactividad relativa diferente hacia VCA-P18 y VCA-P40 virales.

50 Figura 3

Inmunotransferencias de tres sueros humanos (suero 92, suero 214 y suero 219) en tiras de nitrocelulosa preabsorbidas con las siguientes cantidades de proteína de fusión BFRF3- β -galactosidasa:

- 55 banda 1: 0 μ g de BFRF3- β -galactosidasa.
- banda 2: 0,01 μ g de BFRF3- β -galactosidasa
- banda 3: 0,1 μ g de BFRF3- β -galactosidasa.
- 60 banda 4: 0,5 μ g de BFRF3- β -galactosidasa.
- banda 5: 1 μ g de BFRF3- β -galactosidasa.

65 La banda en la que solamente está presente β -galactosidasa se indica como banda β .

ES 2 298 325 T3

Figura 4

Resultados del análisis PEPSCAN: Porcentaje de 15 sueros humanos de donantes seropositivos para EBV sanos, reactivos con péptidos de 12 monómeros de la secuencia de VCA-18. Las posiciones de inicio de los péptidos de 12 monómeros dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína VCA-P18 se indican en el eje de las X.

Figuras 5a y 5b

Resultados de PEPSCAN (densidad óptica a 450 nm) de un análisis de péptidos de 12 monómeros obtenidos de VCA-p18, usando dos anticuerpos monoclonales de rata dirigidos contra VCA-p18 (EBV.OT15E y EBV.OT15I respectivamente).

Figura 6

Resultados de PEPSCAN de un análisis de péptidos de 12 monómeros obtenidos de la proteína VCA-p40 con un anticuerpo monoclonal de ratón (EBV.OT41A) dirigido contra VCA-p40.

Figura 7

Reactividad en ELISA (densidad óptica a 450 nm) de 43 muestras de suero humano obtenido de donantes de sangre sanos, ensayadas para la reactividad de IgG contra péptidos sintéticos seleccionados obtenidos de la proteína VCA-p18 codificada por BFRF3.

Δ indica sueros negativos mediante análisis serológico convencional

□ indica sueros positivos mediante análisis serológico convencional

◇ indica sueros indeterminados para anticuerpos contra EBV mediante análisis serológicos convencionales pero negativos en la inmunotransferencia.

* Indica sueros positivos mediante serología convencional pero negativos para anticuerpos anti-p18 en la inmunotransferencia.

Péptido 1: H₂N-GVPRRQRAIDKRQRA-COOH

Péptido 2: H₂N-GQPHDTAPRGARKKQ-COOH

Péptido 3: H₂N-AVDTGSGGGGQPHDTAPRGARKKQ-COOH

Péptido 4: H₂N-STAVAQSATPSVSSSISSLRAATSGATAAA-COOH

Péptido 5: Péptido de combinación del péptido 3 y 4 unidos mediante puentes S-S.

Figura 8 a, b, c

Análisis de la inmunorreactividad (ELISA) del péptido de combinación nº 5 con:

a) IgG humana (76 sueros positivos para VCA-I.F.)

b) IgM humana (26 sueros positivos para IgM)

c) IgA humana (35 sueros de pacientes de NPC).

Ejemplos

Ejemplo 1

Procedimiento para aislar e identificar nuevas secuencias de ADN que codifican proteínas de EBV.

La estrategia general seguida para la identificación que da como resultado las nuevas moléculas marcadoras de EBV puede subdividirse en las siguientes fases.

1. Identificación y producción de reactivos de anticuerpo que son específicamente reactivos con las moléculas marcadoras de EBV.

ES 2 298 325 T3

2. Preparación de un banco de ADNc a partir de ARNm de células totales o seleccionado con poli A, aislado a partir de células que expresan EBV o preparación de un banco de ADN genómico a partir de fragmentos del genoma viral, preferiblemente en el fago lambda gt11, seguido de selección de las proteínas sintetizadas en el fago con los reactivos de anticuerpo anteriores.

5

3. Purificación de los fagos reactivos e identificación de las secuencias insertadas específicas de EBV contenidas dentro del genoma de los fagos.

4. Correlación de las secuencias insertadas con la secuencia prototipo del genoma de EBV publicada para situar los marcos de lectura abiertos específicos de EBV correspondientes.

10

5. Clonación, expresión y producción de los marcos de lectura abiertos identificados en células hospedadoras alternativas tales como *E. coli*, baculovirus, levaduras o células de eucariotas superiores o en sistemas de producción con expresión alternativa.

15

Estos procedimientos se describen con detalle a continuación y se ilustran mediante el esquema que se representa en la Figura 1.

Fase 1

20

Cultivos celulares y extractos celulares

La línea celular obtenida de P3HR1, HH514.c16 se propagó como cultivo en suspensión en frascos rotativos y se indujo la expresión de VCA y de EA usando 20 ng/ml de 12-tetradecanoforbol-13-acetato (TPA) y butirato de sodio 3 mM exactamente como describen Middeldorp y Herbrink (J. Virol. Meth., 21, 133-146, 1988). Para la expresión selectiva de solamente antígenos de EA, se bloqueó la polimerasa de ADN viral mediante la adición de ácido fosfonoacético 0,5 mM al cultivo celular inducido.

25

Anticuerpos monoclonales

30

Para la producción de anticuerpos monoclonales, se inmunizaron ratones BALB/c con la fracción nuclear de células HH514 inducidas mediante VCA (F. Wielaard *et al.*, J. Virol. Meth., 21, 105-115, 1988) o con proteínas purificadas de forma más exhaustiva a partir de estas células o a partir de sistemas de expresión alternativos. Los hibridomas se produjeron de acuerdo con protocolos convencionales y los sobrenadantes se analizaron en ensayos de inmunofluorescencia para EBV convencionales y en tiras de inmunotransferencia que contenían extractos del antígeno de células HH514 inducidas por VCA de acuerdo con lo descrito por Middeldorp y Herbrink, J. Virol. Meth., 21, 133-146, 1988).

35

Purificación por afinidad de anticuerpos anti VCA-p18

Los anticuerpos anti-VCA-p18 se purificaron a partir de un suero humano positivo para EBV de acuerdo con el método de Robinson y Miller (The herpesviruses, Vol. 1, 151-192, 1991, Publ. Plenum Publishing Corp. Nueva York) con algunas modificaciones menores. En resumen, después de la separación por electroforesis en geles de acrilamida al 10%, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore Corporation, Redford, USA) y la región de la membrana de PVDF correspondiente a VCA-p18 se cortó y se usó como matriz de afinidad. La unión no específica de anticuerpos a las tiras se evitó mediante la incubación durante una noche en solución de bloqueo (leche en polvo al 5%, suero de caballo al 4% en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,5 (PBS)). En lo sucesivo, las tiras se incubaron con suero humano diluido (1:25 en solución de bloqueo) durante 2 horas. Después de tres etapas de lavado con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% los anticuerpos unidos se eluyeron con glicina 0,1 M, pH 2,7 en dos incubaciones consecutivas. El eluato se neutralizó con 1/20avo de volumen de Tris/HCl 1 M, pH 9,0. Finalmente, el eluato se dializó contra PBS y se almacenó en alícuotas a -20°C.

50

Fase 2

Purificación del ARN de células HH514.c16

55

Se aisló ARN total a partir de células HH514.c16 inducidas mediante el procedimiento de guanidinio/CsCl de acuerdo con lo descrito por Maniatis *et al.* (Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1982). La purificación de ARN poli (A⁺) se realizó mediante cromatografía en oligo (dT) (Pharmacia, Inc., Piscataway, N.Y.) de acuerdo con lo descrito por Ausubel *et al.* (Current protocols in molecular biology (1991) Greene Publishing Associates, John Wiely & Sons, Nueva York).

60

Análisis de transferencia de Northern

El ARN total (10 µg) se desnaturalizó mediante glioxal (P.S. Thomas, Methods in Enzymology, 100, 255-266, 1983) y se corrió en geles de agarosa. Después de la tinción con bromuro de etidio, el ARN separado se transfirió al vacío a nitrocelulosa. Después de 3 horas de prehibridación, el filtro se hibridó durante una noche a 42°C con sondas de ADN iniciadas de forma aleatoria o con desplazamiento de corte marcadas con [α -32P] (Amersham, Bristol, UK). Las soluciones de hibridación estaban constituidas por formamida al 50%, 5 volúmenes de SSPE, 5 volúmenes de

65

ES 2 298 325 T3

solución de Denhardt (polivinilpirrolidona al 0,1% (v/v) BSA al 0,1% (v/v) Ficoll al 0,1% (v/v)), 0,2 mg de ADN de esperma de arenque sonificado por ml y SDS al 0,5%. Posteriormente, las transferencias se lavaron y se expusieron a un haz de rayos X (Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y., USA) usando pantallas de intensificación.

5 *Construcción de la biblioteca de ADNc en lambda-gt11*

Cinco microgramos de ARN seleccionado con poli (A⁺) se desnaturalizaron con hidróxido de metilmercurio. La síntesis de ADNc se inició con oligo(dT) o hexanucleótidos. Los procedimientos para la síntesis de la primera y la segunda cadenas eran idénticos a los descritos por Gubler y Hoffman (Gene, 26, 263-269, 1983). Después de la metilación con EcoRI, la adición del enlazador EcoRI y digestión con EcoRI, el ADNc modificado se seleccionó por tamaños mediante cromatografía en Sepharose CL4B (Pharmacia) de acuerdo con lo descrito por Maniatis *et al.* El ADNc con un tamaño que variaba entre 0,5 kB y 3,0 kB se ligó en los brazos de lambda-gt11 tratados con fosfatasa, seguido de compactación *in vitro* usando el kit Packagene (Promega, San Diego, USA).

15 *Exploración inmunológica de la biblioteca de lambda-gt11*

Se seleccionaron un total de 1×10^4 fagos recombinantes de la biblioteca iniciada con oligo(dT) y 5×10^5 recombinantes de la biblioteca iniciada con hexanucleótidos para la reactividad inmunológica (véase Maniatis *et al.*) con anticuerpos anti-p18 humanos purificados por afinidad o el anticuerpo monoclonal EBV.OT41A. Las placas inmunorreactivas se detectaron con IgG anti-humana o anti-ratón conjugada con fosfatasa alcalina, respectivamente, de acuerdo con lo descrito por el fabricante (Promega).

Fase 3

25 *Análisis de la secuencia de nucleótidos*

El ADN insertado de las placas positivas, purificado mediante desplazamiento en placas repetido e inmunotransferencia, se amplificó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores de las secuencias flanqueantes de lambda-gt11 que contenían sitios de restricción en su extremo 5'. Después de la digestión con la enzima de restricción apropiada, el fragmento de ADN se subclonó en pGEM-4Z y se secuenció a partir de ambos extremos usando un kit de secuenciación (Pharmacia, Uppsala, Suecia) que emplea una modificación del método de Sanger *et al.*, (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467, 1977).

Fase 4

35 *Alineamiento de secuencias*

Las secuencias se alinearon con la secuencia publicada del prototipo EBV-B95-8 (Baer *et al.*, Nature 310, 207-211, 1984) y se depositaron en la base de datos de secuencias EMBL, usando los programas del software de la Universidad de Wisconsin, genetics computer group (Gribshov *et al.* Nucl. Acid res., 14, 327-334, 1986).

Fase 5

45 *Clonación y expresión de BFRF3 y BDRF1 en E. coli*

Los marcos de lectura abiertos codificados en el genoma de EBV (ORF), BFRF3 y BDRF1, se amplificaron mediante PCR usando ADN viral, se purificaron a partir de viriones aislados mediante centrifugación por gradiente de densidad de sacarosa a partir de sobrenadantes del cultivo de HH514.c16 como diana. Los cebadores de cada conjunto que contenían sitios de restricción en su extremo 5' se usaron para clonar el fragmento amplificado en el sitio EcoRI-HindIII del vector de expresión pMLB1113 (un derivado de PBR322) (Zagurski y Berman, Gene, 27, 183-101, 1984) que se sitúa en el quinto codón del extremo 5' del gen LacZ. Las proteínas expresadas a partir de estas construcciones estaban constituidas por los primeros 5 aminoácidos de β -galactosidasa seguidos por la proteína recombinante unida en su extremo C con el resto de la β -galactosidasa. Las proteínas no de fusión se construyeron análogamente, pero con un codón de terminación insertado en el extremo 3' del inserto.

55 *Expresión en E. coli de proteínas recombinantes*

Los cultivos de *E. coli* transformada se indujeron mediante la adición de IPTG 1 mM (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido). A las 2 horas después de la inducción se recogieron células bacterianas mediante centrifugación y se suspendieron en un tampón de muestra de SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunotransferencia.

Ejemplo 2

65 *Inmunorreactividad de las proteínas VCA-p18 y VCA-p40*

La inmunorreactividad de las proteínas obtenidas siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se investigó mediante análisis de inmunotransferencia. Para este fin, las proteínas de la célula completa de células HH514.c16 inducidas con VCA o de *E. coli* que expresaban las proteínas de fusión BFRF3- o BDRF1- β -galactosidasa o β -galac-

ES 2 298 325 T3

tosidasa en solitario, se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. Las tiras preparadas a partir de estas transferencias se incubaron con sueros individuales y preparaciones de anticuerpo.

Procedimiento de inmunotransferencia

5 El procedimiento de inmunotransferencia se realizó esencialmente de acuerdo con lo descrito por Middeldorp y Herbrink (J. Virol. Meth., 21, págs. 133-159, 1988) y se describe de forma resumida a continuación: después del SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (0,2 μ m Schleicher & Schuell, Den Bosch, Países Bajos). La unión no específica de anticuerpos a los filtros se evitó mediante incubación durante al menos 1 hora a temperatura ambiente (TA) con tampón de bloqueo (leche en polvo al 4%, suero de caballo al 5% en solución salina tamponada con Tris (TBS)). Los sueros humanos se diluyeron hasta una dilución apropiada en tampón de bloqueo y se incubaron durante al menos 1 hora. Las transferencias o las tiras se lavaron tres veces en TBS + Tween 20 al 0,05% (TBSt) y se añadieron anticuerpo anti-IgG humano conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Promega) o IgG anti-ratón conjugado con HRP o IgG anti-rata (Organon Teknika Cappel, Boxtel, Países Bajos) a la dilución apropiada en tampón de bloqueo. Después de etapas de incubación y de aclarado adicionales, la transferencia se desarrolló usando nitrozul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) como sustratos para AP y 4-cloro-naftol para HRP.

Las transferencias resultantes se representan en la Figura 2a-d. Los sueros usados en las bandas 1-12 de las transferencias eran respectivamente:

1. anticuerpo monoclonal de ratón contra β -Gal (Promega)
2. anticuerpo monoclonal de ratón contra VCA-P40 generado inmunizando con proteínas naturales de la cápsida viral (EBV.OT41A)
3. anticuerpo humano mono específico para VCA-P18 viral obtenido mediante purificación por inmunofinidad específica con VCA-P18 viral
- 4-5. sueros humanos seronegativos para EBV
- 6-16. sueros humanos seropositivos para EBV con una reactividad relativa diferente hacia VCA-P18 viral y VCA-P40 viral.

La Figura 2a muestra la inmunorreactividad de los polipéptidos virales naturales, separados reduciendo SDS-PAGE en acrilamida al 12,5%. Los anticuerpos anti- β -galactosidasa son negativos (1), mientras que los anti-suero específicos para VCA-p40 (2) y VCA-p18 (3) reaccionan con las proteínas virales respectivas. Las tiras 4 y 5, teñidas con sueros humanos negativos para EBV, no muestran reactividad, mientras que las tiras 6-16 representan inmunorreactividades diferentes con proteínas de EBV de acuerdo con lo descubierto en donantes de sangre seropositivos sanos normales (6-15) o pacientes con enfermedad por EBV activa (16). Las posiciones de las bandas de VCA-p18 y VCA-p40 se indican en el lado derecho.

La Figura 2b muestra la inmunorreactividad de proteínas de la célula completa de *E. coli* que expresa la proteína de fusión VCA-p18 β -galactosidasa (BFRF3-LacZ) separadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras en acrilamida al 10%. Los anticuerpos anti- β -galactosidasa (1) y anti VCA-p18 (3) reaccionan específicamente con varias bandas de proteína que se deben a la fragmentación proteolítica en *E. coli* de la proteína de fusión original a 134 kDa. El anticuerpo monoclonal anti-VCA-p40 (2) es negativo, al igual que los sueros humanos negativos para EBV (4-5). Los sueros humanos con diferentes reactividades para VCA-p18 viral muestran similares reactividades diferentes en la proteína de fusión. De nuevo la tinción de las múltiples bandas se debe a la rotura proteolítica de la proteína de fusión en *E. coli*.

La Figura 2c muestra el mismo análisis para la proteína de fusión VCA-p40- β -galactosidasa en *E. coli*, que es menos sensible a la proteólisis, dando como resultado una única banda a 156 kDa. La interpretación de la figura 2c es análoga a la de la 2b.

La Figura 2d representa una transferencia de control de *E. coli* que solamente expresa β -galactosidasa.

A partir del estudio descrito anteriormente, es evidente que las construcciones de *E. coli* individuales expresan las proteínas de fusión respectivas. Los sueros humanos muestran la misma reactividad hacia las proteínas expresadas que hacia las proteínas virales naturales.

Ejemplo 3

Inmunoadsorción

La identidad inmunoquímica de un péptido alternativo de acuerdo con la invención y la proteína viral natural correspondiente puede demostrarse mediante pre-absorción de sueros humanos, reactivos en inmunotransferencias que contienen proteína(s) viral(es) natural(es), con diferentes concentraciones del péptido de acuerdo con la invención, dando como resultado la desaparición de reactividad de anticuerpos específica para la correspondiente proteína viral

ES 2 298 325 T3

natural en la transferencia. Además de demostrar la identidad inmunoquímica, esta técnica proporciona pruebas sólidas de que la inmunoreactividad de una proteína viral en inmunotransferencias está mediada por la unión del anticuerpo a una única especie (dominante) de proteína.

5 Se realizó un experimento como se ha descrito anteriormente para la proteína marcadora VCA-p18:

10 La inmunoreactividad de los sueros humanos (suero 92, suero 214 y suero 219), obtenidos a partir de tres donantes seropositivos para EBV sanos, se estudió mediante un análisis de inmunotransferencia en tiras de nitrocelulosa que contenían antígenos nucleares de células HH514 inducida por VCA, separadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras en geles de acrilamida al 10%. Los sueros se pre-absorbieron durante una noche a 4°C con cantidades en aumento de proteína de fusión BFRF3- β -galactosidasa purificada o con β -galactosidasa en solitario antes del análisis de inmunotransferencia. (La tinción para la reactividad de IgG se realizó con IgG anti-humana de oveja marcada con peroxidasa), usando N-cloro-naftol como sustrato de precipitación.

15 Los resultados de este experimento se ilustran mediante la Figura 3. Las cantidades de proteína de fusión BFRF3- β -galactosidasa purificada usada en la pre-absorción de 1 ml de suero diluido a 1:100 analizado en las respectivas bandas de las inmunotransferencias como se representa en la Figura 3 eran:

- 20 banda 1: 0 μ g de BFRF3- β -galactosidasa
banda 2: 0,01 μ g de BFRF3- β -galactosidasa
banda 3: 0,1 μ g de BFRF3- β -galactosidasa
25 banda 4: 0,5 μ g de BFRF3- β -galactosidasa
banda 5: 1 μ g de BFRF3- β -galactosidasa

30 La banda en la que sólo se usó β -galactosidasa para la pre-absorción se indica como banda β .

A partir de la Figura 3 puede observarse que la reactividad de la banda que representa VCA-p18 (flecha) desaparece con las concentraciones en aumento de la proteína de fusión BFRF3- β -galactosidasa durante la pre-absorción. La pre-absorción con β -galactosidasa en solitario no tuvo ningún efecto, mientras que la reactividad con otras proteínas de EBV, no realiza con ninguna de las pre-absorciones. La tinción de proteínas no relacionadas (por ejemplo EBNA a 72 kD o VCA-p40 a 40 kD) no se realiza.

40 A partir del experimento descrito anteriormente, es evidente que la inmunotinción de VCA-p18 viral mediante anticuerpos del suero humano es inhibida específicamente mediante la pre-absorción de estos sueros con proteínas de fusión de BFRF3, lo que demuestra la identidad inmunoquímica de VCA-p18 y la proteína codificada por el marco de lectura BFRF3. Estos experimentos también indican que la reactividad de sueros humanos con VCA-18 está causada por la interacción con una única proteína viral.

Ejemplo 4

45 *Localización de epítomos inmunorreactivos mediante PEPSCAN*

Síntesis e inmunoselección de péptidos (PEPSCAN)

50 Se sintetizaron péptidos con una longitud de 12 aminoácidos (AA) y un solapamiento de 11 AA en la secuencia de AA de los ORF BFRF3 y BDRF1 mediante síntesis de péptidos en fase sólida automatizada en clavijas de polietileno activadas químicamente como se ha descrito originalmente por Geijsen *et al.* (Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 83, 3998-4002, 1984). La inmunoreactividad para anticuerpos específicos para EBV, usando 15 sueros de donantes seropositivos para EBV sanos, se determinó de acuerdo con lo descrito por Middeldorp y Melen (J. Virol. meth., 21, 147-159, 1988). Los resultados del análisis PEPSCAN de péptidos de 12 AA obtenidos de la secuencia VCA-p18 se representan en la Figura 4. Los números en el eje de las X representan la posición inicial de la secuencia VCA-p18 de cada péptido de 12 monómeros analizado. En el eje de las Y en la Figura 4 se indica el porcentaje de sueros humanos reactivos con cierto péptido de 12 monómeros de la proteína VCA-p18 codificado en el marco de lectura BFRF3. La reacción positiva se define como 3 veces la desviación típica por encima de la reactividad media de suero humano seronegativo para EBV en el mismo conjunto de clavijas. A partir de la Figura 4, pueden definirse tres dominios inmunodominantes: Dominio I: AA 120-140, Dominio II: AA 152-155, Dominio III: AA 159-165 (estos números indican de nuevo la posición inicial de los péptidos de 12 monómeros usados para PEPSCAN). La Tabla 1 proporciona una descripción detallada de los péptidos más reactivos para cada suero individual usado en este estudio. En la primera banda de la Tabla 1, se indica el número de sueros individuales. La segunda banda indica el valor de PEPSCAN a DO450 (Densidad Óptica a 450 nm) para el péptido más reactivo dentro del dominio I, péptido que se indica en la banda 3. Las bandas 4 y 5 representan datos similares para el dominio II y el dominio III.

ES 2 298 325 T3

TABLA 1

Respuesta inmunológica de 15 sueros positivos para VCA-p18 de EBV

5 (Solamente se ilustra la respuesta del péptido más reactivo situado en los dominios del epítipo importante de VCA-p18).

Suero Nº	Dominio I (pép. 120-140)		Dominio II (pép. 152-155)		Dominio III (pép. 159-165)	
	Elisa	Secuencia de A.A. del	Elisa	Secuencia de A.A. del	Elisa	Secuencia de A.A. del
	DO ₄₅₀	Péptido	DO ₄₅₀	Péptido	DO ₄₅₀	Péptido
1	1,418	120-TAVAQSATPSVS-132	-	-	-	-
2	1,820	120-TAVAQSATPSVS-132	0,678	155-DTGSGGGGQPHD-167	0,423	162-GQPHDTAPRGAR-174
3	1,228	128-PSVSSSISSLRA-140	-	-	0,808	162-GQPHDTAPRGAR-174
4	1,230	128-PSVSSSISSLRA-140	-	-	0,761	162-GQPHDTAPRGAR-174
5	0,540	128-PSVSSSISSLRA-140	-	-	1,354	162-GQPHDTAPRGAR-174
6	0,731	129-SVSSSISSLRAA-141	-	-	1,441	162-GQPHDTAPRGAR-174
7	0,385	129-SVSSSISSLRAA-141	-	-	0,770	163-QPHDTAPRGARK-175
8	1,360	131-SSSISSLRAATS-143	-	-	1,343	160-GGGQPHDTAPRG-172
9	1,598	131-SSSISSLRAATS-143	0,510	153-AVDTGSGGGGQP-165	1,481	162-GQPHDTAPRGAR-174
10	1,591	131-SSSISSLRAATS-143	0,474	153-AVDTGSGGGGQP-165	1,481	162-GQPHDTAPRGAR-174
11	1,251	131-SSSISSLRAATS-143	0,958	152-AAVDTGSGGGGQ-164	0,774	162-GQPHDTAPRGAR-174
12	1,839	133-SISSLRAATSGA-145	-	-	0,407	162-GQPHDTAPRGAR-174
13	1,128	134-ISSLRAATSGAT-146	0,460	154-VDTGSGGGGQPH-166	1,435	162-GQPHDTAPRGAR-174
14	1,064	138-RAATSGATAAAS-150	-	-	1,319	162-GQPHDTAPRGAR-174
15	0,695	138-RAATSGATAAAS-150	-	-	0,644	162-GQPHDTAPRGAR-174

Ejemplo 5

45 *Análisis PEPSCAN con anticuerpos monoclonales de rata y de ratón dirigidos contra la proteína VCA-p18 codificada en BFRF3 o la proteína VCA-p40 codificada en BdRF1*

50 Se realizó el análisis PEPSCAN de forma similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 4, para sueros humanos, para determinar la posición de los epítipos lineales detectados mediante anticuerpos monoclonales.

Las Figuras 5a y 5b muestran los resultados de PEPSCAN de dicho análisis usando dos anticuerpos monoclonales de rata dirigidos contra VCA-p18 (EBV.OT15E y EBV.OT15I respectivamente), detectando cada uno un epítipo lineal diferente.

55 La Figura 6 muestra los resultados de PEPSCAN para un anticuerpo monoclonal de ratón (EBV.OT41A) dirigido contra VCA-p40 codificado por el marco de lectura BdRF1. Los análisis cruzados de los dos anticuerpos monoclonales de rata en la secuencia de VCA-p40 (BdRF1) y viceversa del anticuerpo monoclonal de ratón en la secuencia de VCA-p18 (BFRF3) dieron resultados negativos claros.

60 A partir de la Figura 6, es evidente que EBV.OT41A reconoce un epítipo lineal diferente en la región C-terminal de la proteína VCA-p40.

65

Ejemplo 6

Selección de péptidos sintéticos obtenidos de la proteína VCA-p18 codificada por BFRF3 mediante análisis informáticos y PEPSCAN y análisis de la inmunorreactividad de estos péptidos con sueros de donantes humanos normales

Los péptidos sintéticos se prepararon mediante síntesis en fase sólida convencional usando química t-BOC.

Los péptidos a partir de la proteína VCA-p18 codificada por BFRF3 se seleccionaron en base a la alta antigenicidad predicha usando el programa informático “antigenic index” desarrollado por Jameson y Wolf (CABIOS 4, 181-186, 1988) [los péptidos 1 y 2 de la Figura 7 se seleccionaron en base a esto] o en base a la alta reactividad con el antígeno funcional en PEPSCAN como se ha descrito en el Ejemplo 4. [Los péptidos 3 y 4 de la Figura 7 se seleccionaron en base a esto, representando el dominio I más II y el dominio III de la tabla 1]. Además, se preparó un péptido de combinación (péptido 5 en la Figura 7) que representa una combinación de los tres dominios más reactivos identificados por PEPSCAN, dejando aparte las regiones peptídicas que muestran baja reactividad en PEPSCAN.

Los péptidos 1-5 con las secuencias de aminoácidos como se indican a continuación se extendieron sobre la fase sólida, es decir los pocillos de placas de microtitulación de poliestireno, a 1 µg por mililitro en tampón NHCO₃ 0,05 M a pH 9,6 durante una noche a 4°C. Después de lavar dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4, los pocillos se rellenaron con 100 µl de suero humano, diluido a 1:100 en PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados con PBS-T, se añadieron anticuerpos de IgG anti-humano de oveja marcados con HRP a la dilución apropiada en PBS-T y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados con PBS-T, se detectó la actividad de la enzima unida usando tetrametilbencidina como sustrato. La reacción se interrumpió a los 30 minutos añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 1 M. La absorbancia se midió a 450 nm usando un fotómetro Multiscan. Los sueros se ensayaron para anticuerpos contra EBV usando serología de inmunofluorescencia convencional o análisis de inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente.

Los péptidos usados eran:

Péptido 1: H₂N-GVPRRQRAIDKRQRA-COOH

Péptido 2: H₂N-GQPHDTAPRGARKKQ-COOH

Péptido 3: H₂N-AVDTGSGGGGQPHDTAPRGARKKQ-COOH

Péptido 4: H₂N-STAVAQSATPSVSSSISSLRAATSGATAAA-COOH

Péptido 5: Péptido de combinación del péptido 4 y 3 unidos mediante puentes S-S, usando restos de cisteína extra en el extremo C del péptido 4 y en el extremo N del péptido 3.

La Figura 7 muestra los resultados del experimento de ELISA usando los péptidos 1-5 extendidos sobre la fase sólida y un panel aleatorio de sueros de donantes de sangre sanos humanos, usados a dilución 1:100 de acuerdo con procedimientos convencionales.

Posteriormente estos sueros se ensayaron mediante inmunotransferencia para la reactividad con VCA-p18 viral.

A partir de estos experimentos, es evidente que la predicción informática basada en el programa “antigenic index” no tiene valor predictivo con respecto a la inmunogenicidad hacia sueros de individuos infectados de forma natural, ya que casi todos los sueros eran negativos con el péptido 1, mientras que el péptido 2 es reactivo solamente con aproximadamente el 50% de los sueros ensayados. Los péptidos seleccionados en base a PEPSCAN muestran buena reactividad con el 60-80% de los sueros ensayados respectivamente. De forma sorprendente, el péptido de combinación que combinaba los péptidos 3 y 4 muestra un 95% de reactividad con sueros humanos. Los sueros negativos para inmunotransferencia con P18 no muestran ninguna reactividad con los péptidos seleccionados.

Ejemplo 7

Reactividad del péptido de combinación 5, obtenido a partir de la proteína VCA-p18 codificada por BFRF3, con anticuerpos de suero humano de diferentes subclases

El péptido de combinación 5, con la secuencia de aminoácidos como se describe en el Ejemplo 6, se usó para analizar la reactividad de inmunoglobulinas de suero humano de diferentes subclases mediante un ELISA (procedimiento como se ha descrito en el Ejemplo 6). En todas las clases se usó el péptido de combinación 5 sobre la fase sólida exactamente como se ha descrito en el Ejemplo 6. La reactividad de los anticuerpos se detectó como se ha descrito en el Ejemplo 6 usando sueros diluidos a 1:100. Los resultados se muestran en la Figura 8. La reactividad de IgM se detectó en sueros humanos pre-absorbidos con Gull-Sorb (Gull Laboratories Inc., Salt Lake City, Utah, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para inhibir la reactividad de IgG. Los anticuerpos de IgM se detectaron con anticuerpos de IgM anti-humanos de oveja marcados con HRP específicos para la cadena pesada de IgM humana.

ES 2 298 325 T3

La reactividad para IgA se detectó también en sueros tratados con Gull Sorb usando anticuerpos secundarios marcados con HRP específicos anti-IgA. Los sueros para la Figura 8a (IgG) se obtuvieron de 76 donantes de sangre seropositivos sanos, positivos para VCA-IgG mediante serología convencional y 9 donantes negativos para anticuerpos contra EBV.

5

Los sueros de la Figura 8b (IgM) se obtuvieron de 26 pacientes de mononucleosis positivos para VCA-IgM mediante serología convencional y 18 donantes sanos negativos para VCA-IgM pero positivos para VCA-IgG.

10

Los sueros para la Figura 8c (IgA) se obtuvieron de 35 pacientes con carcinoma nasofaríngeo confirmado, de los que no estaban disponibles datos específicos para IgA, pero que eran todos positivos para IgG-VCA y de 7 donantes sanos positivos para VCA-IgG.

15

A partir de los experimentos anteriores, puede observarse que el péptido de combinación obtenido de VCA-p18 puede usarse para la detección específica de anticuerpos de IgG, IgM e IgA para VCA de EBV, con una sensibilidad similar o mejor a la de las técnicas serológicas convencionales. Los sueros negativos para EBV son negativos en todas las clases.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido inmunoquímicamente reactivo con anticuerpos para el virus Epstein Barr, que comprende al menos parte de la proteína VCA-p40, codificado dentro del marco de lectura abierto BdRF1 de EBV o una variante funcional del mismo que tiene las mismas propiedades.
- 10 2. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos parte de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 4 o una variante funcional de la misma que tiene las mismas propiedades.
- 10 3. Anticuerpo dirigido específicamente contra un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 15 4. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, siendo el anticuerpo un anticuerpo monoclonal.
- 15 5. Anticuerpo monoclonal [EBV.OT41A] producido por la línea celular de hibridoma de ratón-ratón depositada en la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Porton Down (UK), con el número de depósito 93020414.
- 20 6. Anticuerpo monoclonal que tiene la misma reactividad con VCA-p40 que el anticuerpo monoclonal EBV.OT41A producido por la línea celular de hibridoma de ratón-ratón depositada en la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Porton Down (UK), con el número de depósito 93020414.
- 25 7. Línea celular inmortalizada capaz de producir anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 4, 5 ó 6.
- 25 8. Línea celular inmortalizada, depositada en la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Porton Down (UK), con el número de depósito 93020414.
- 30 9. Anticuerpo anti-idiotipo reactivo con el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, 4, 5 ó 6.
- 30 10. Reactivo inmunoquímico que comprende uno o más péptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 extendido(s) sobre un soporte sólido, siendo dicho(s) péptido(s) sintético(s).
- 35 11. Reactivo inmunológico que comprende uno o más anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 4-6 extendido(s) sobre un soporte sólido.
- 40 12. Método para la detección de anticuerpos dirigidos contra el virus Epstein-Barr en una muestra, **caracterizado** porque un reactivo inmunoquímico de acuerdo con la reivindicación 10 se pone en contacto con la muestra y se detecta la presencia de complejos inmunes formados entre el péptido y anticuerpos en la muestra, lo que es una medida de la presencia de anticuerpos para el virus Epstein-Barr en la muestra.
- 40 13. Método para la detección de virus Epstein-Barr en una muestra, **caracterizado** porque un reactivo inmunológico de acuerdo con la reivindicación 11 se pone en contacto con dicha muestra y se detecta la presencia de complejos inmunes formados, lo que es una medida de la presencia de virus Epstein-Barr en la muestra.
- 45 14. Kit de ensayo para realizar un método de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13.
- 50
- 55
- 60
- 65

FIGURA 1

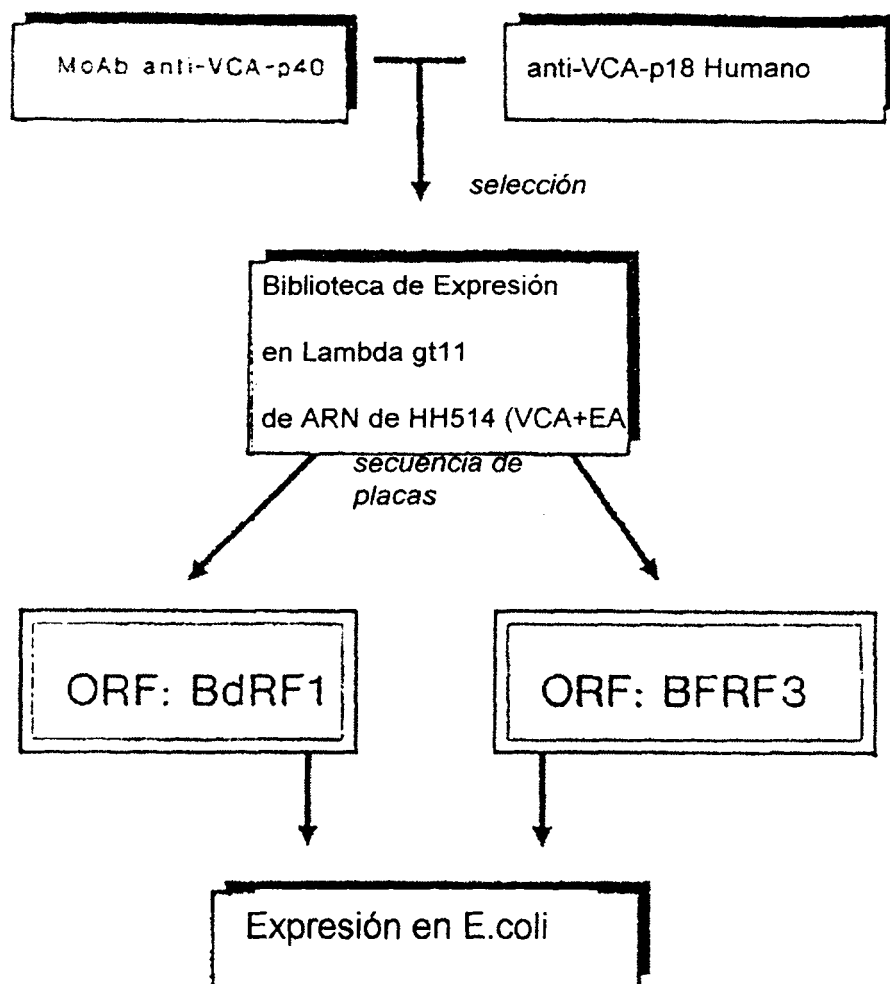


FIGURA 2

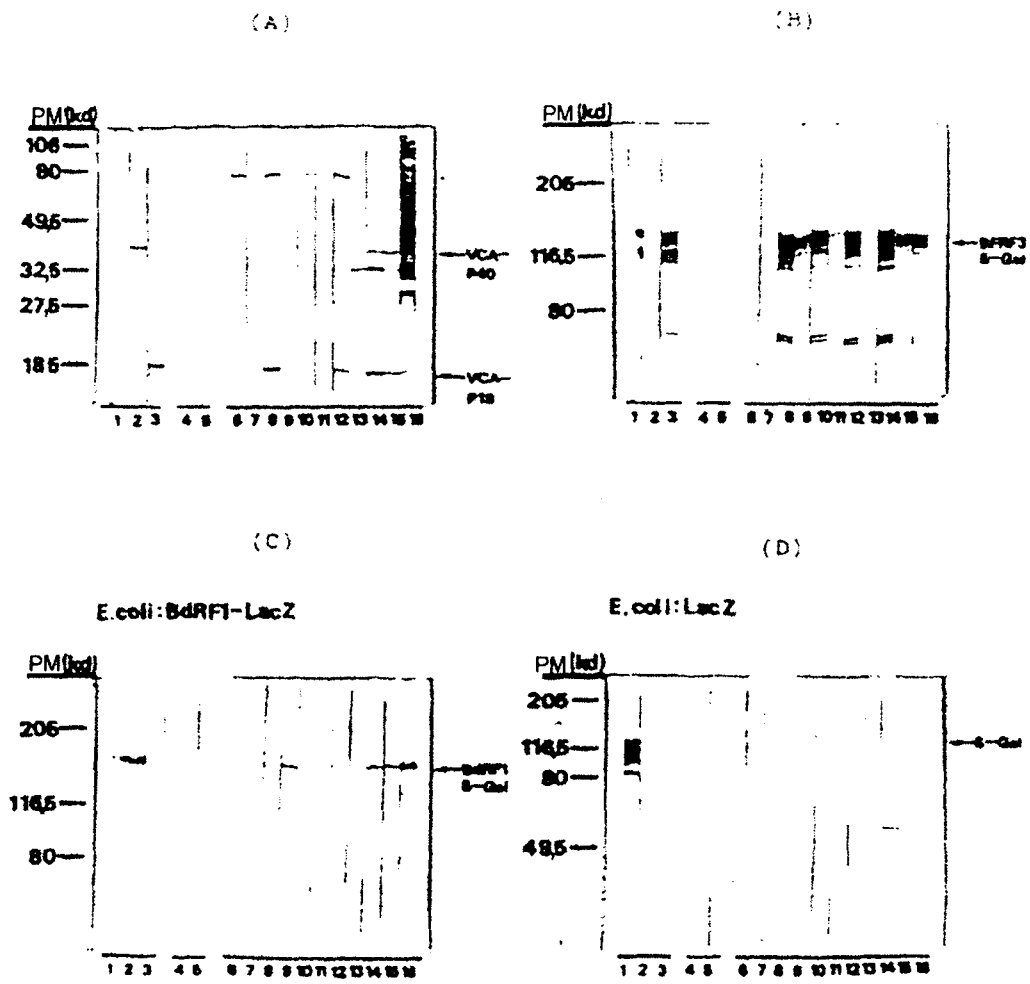


FIGURA 3

INMUNO-ADSORCIÓN

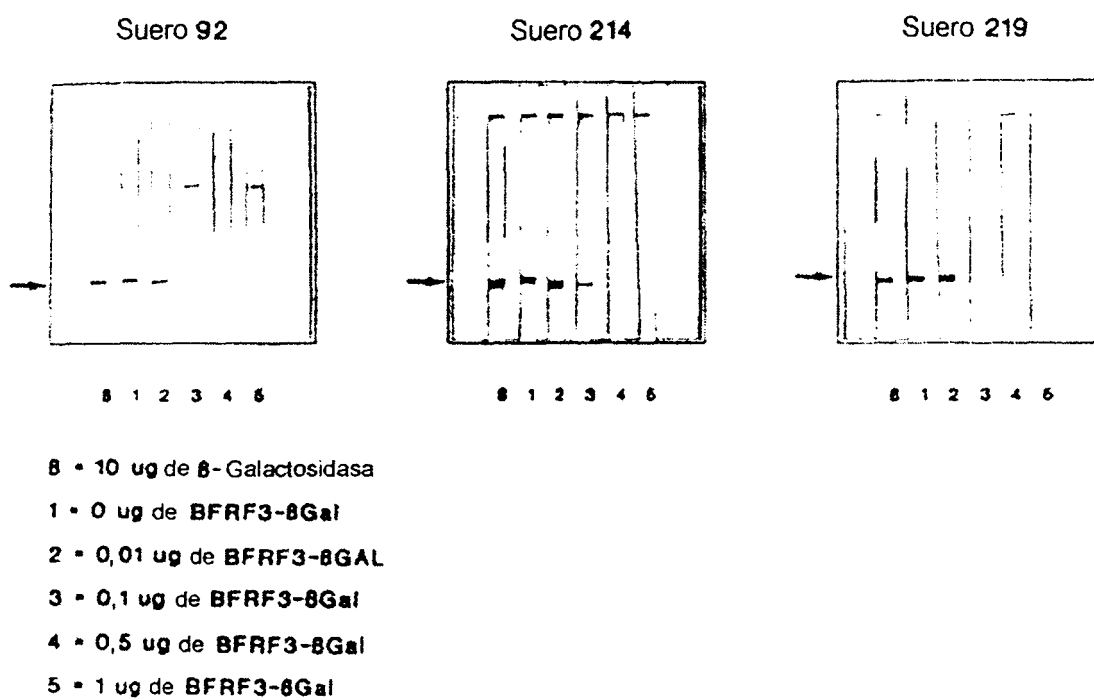


FIGURA 4
RECONOCIMIENTO DEL EPÍTOPO DE VCA-p18
de 15 sueros humanos EBV+

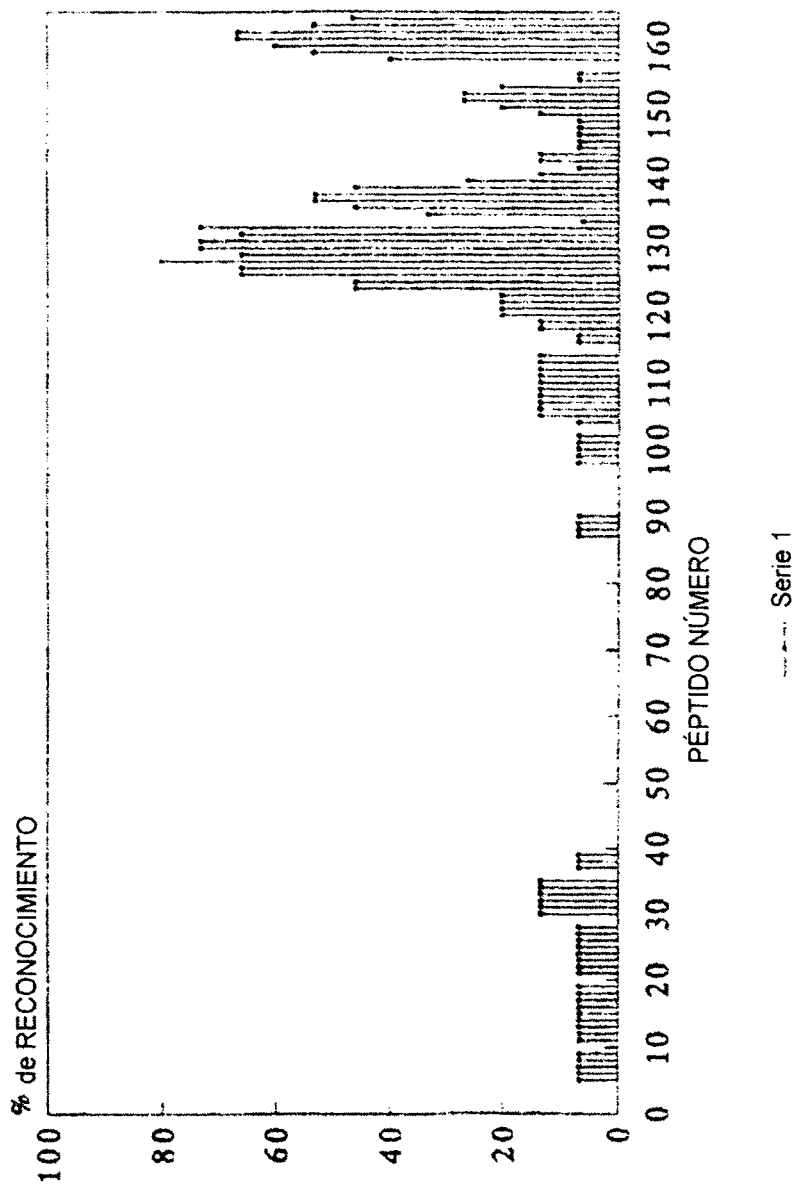


FIGURA 5A

PEPSCAN de EBV.OT15E
de BFRF3

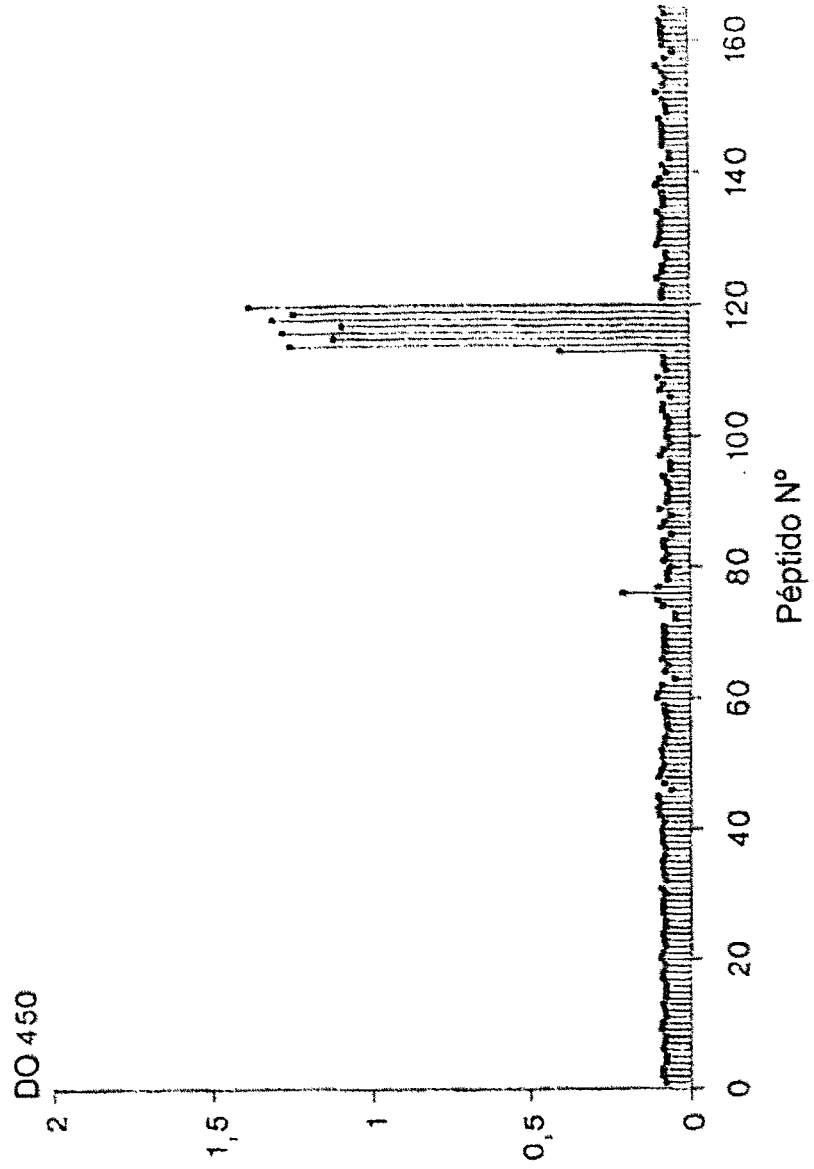


FIGURA 5B

PEPSCAN de EBV.OT151
de BFRF3

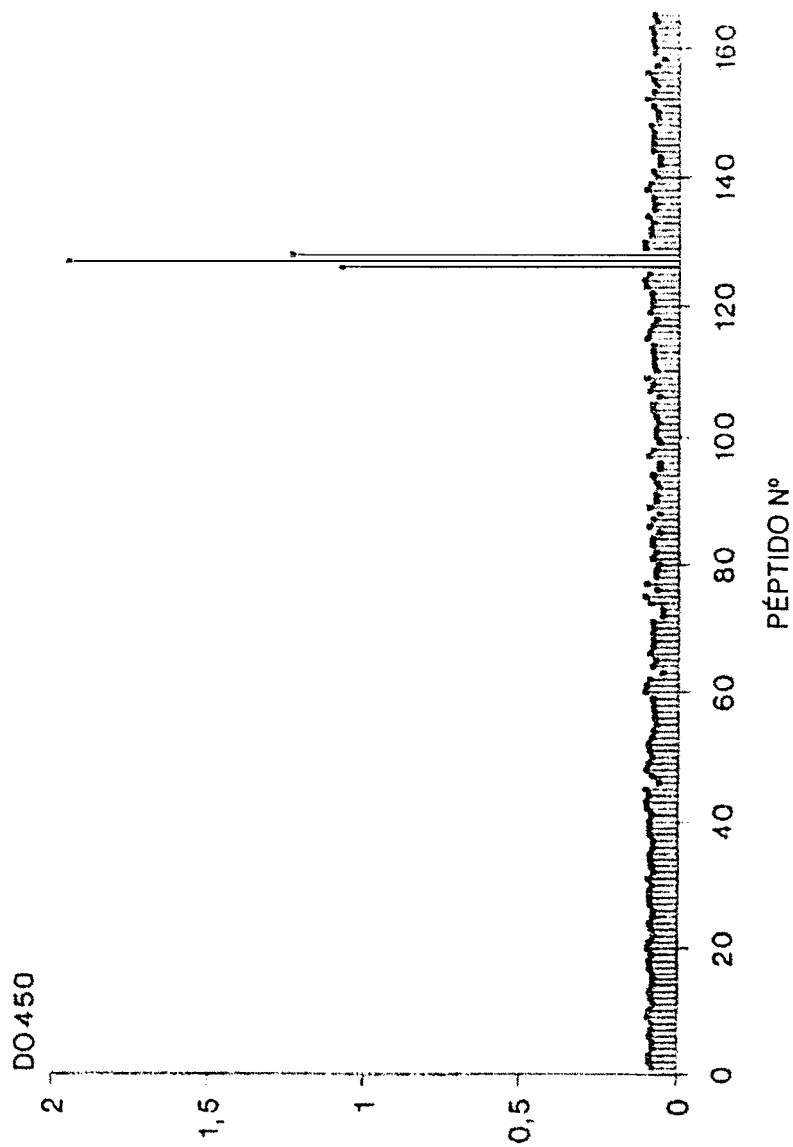


FIGURA 6

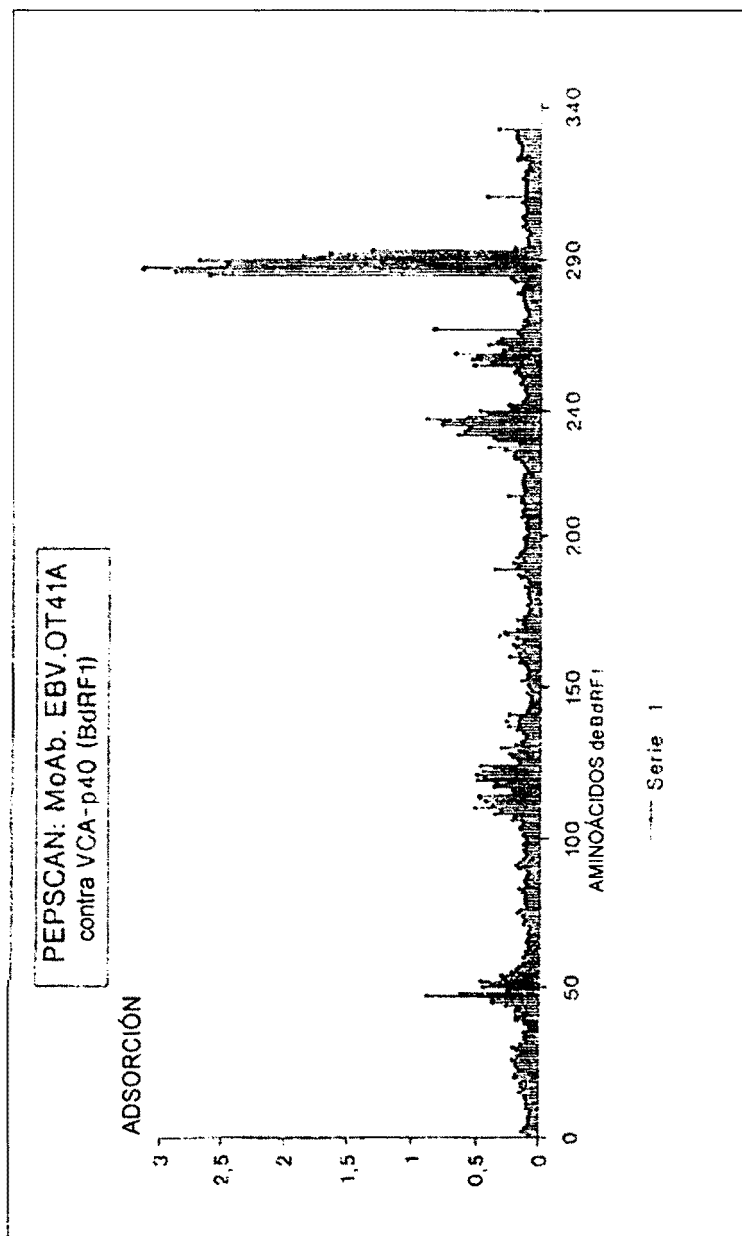


FIGURA 7

péptidos de VCA-p18
Reactividad de 43 donantes de sangre sanos

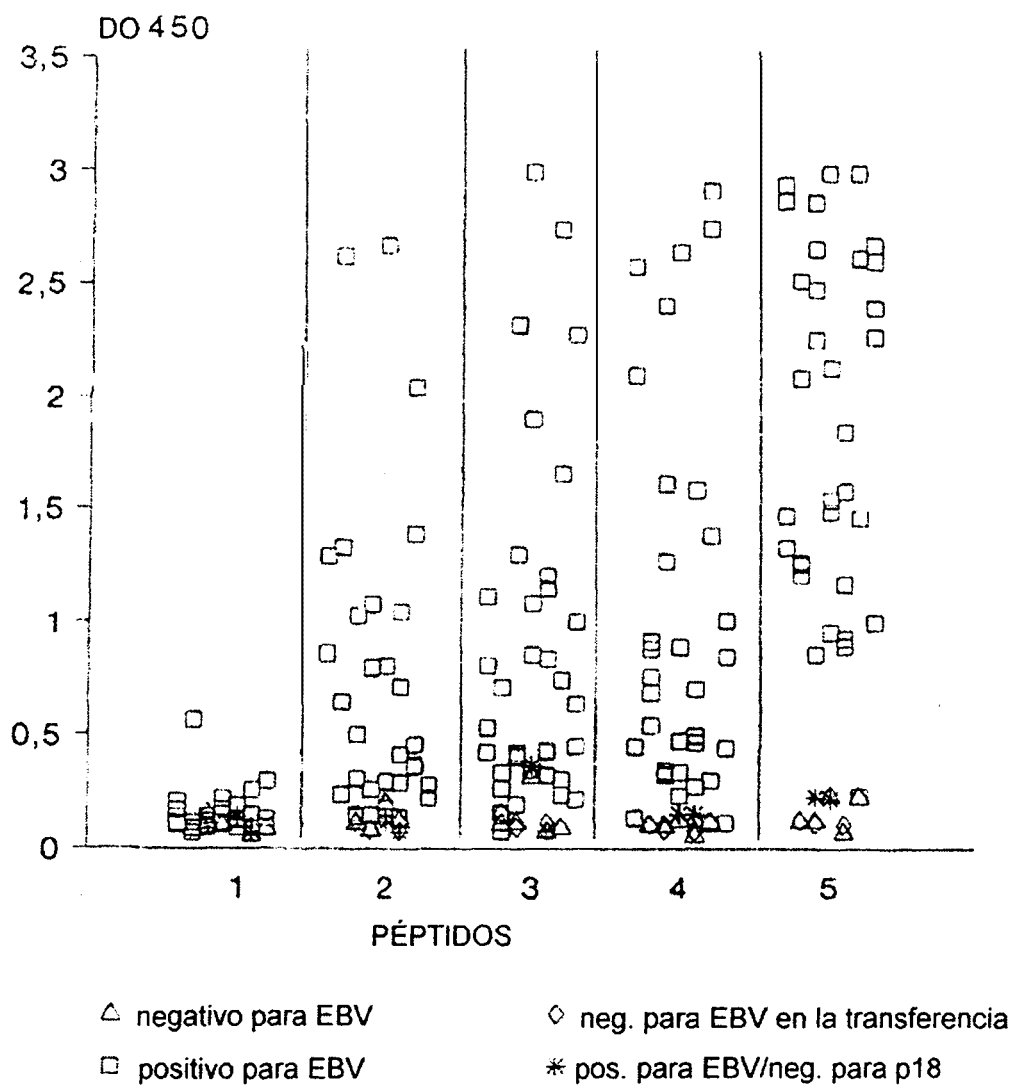


FIGURA 8A

ELISA del péptido VCA-p18 (IgG)
(76 sueros positivos para VCA-I.F.)

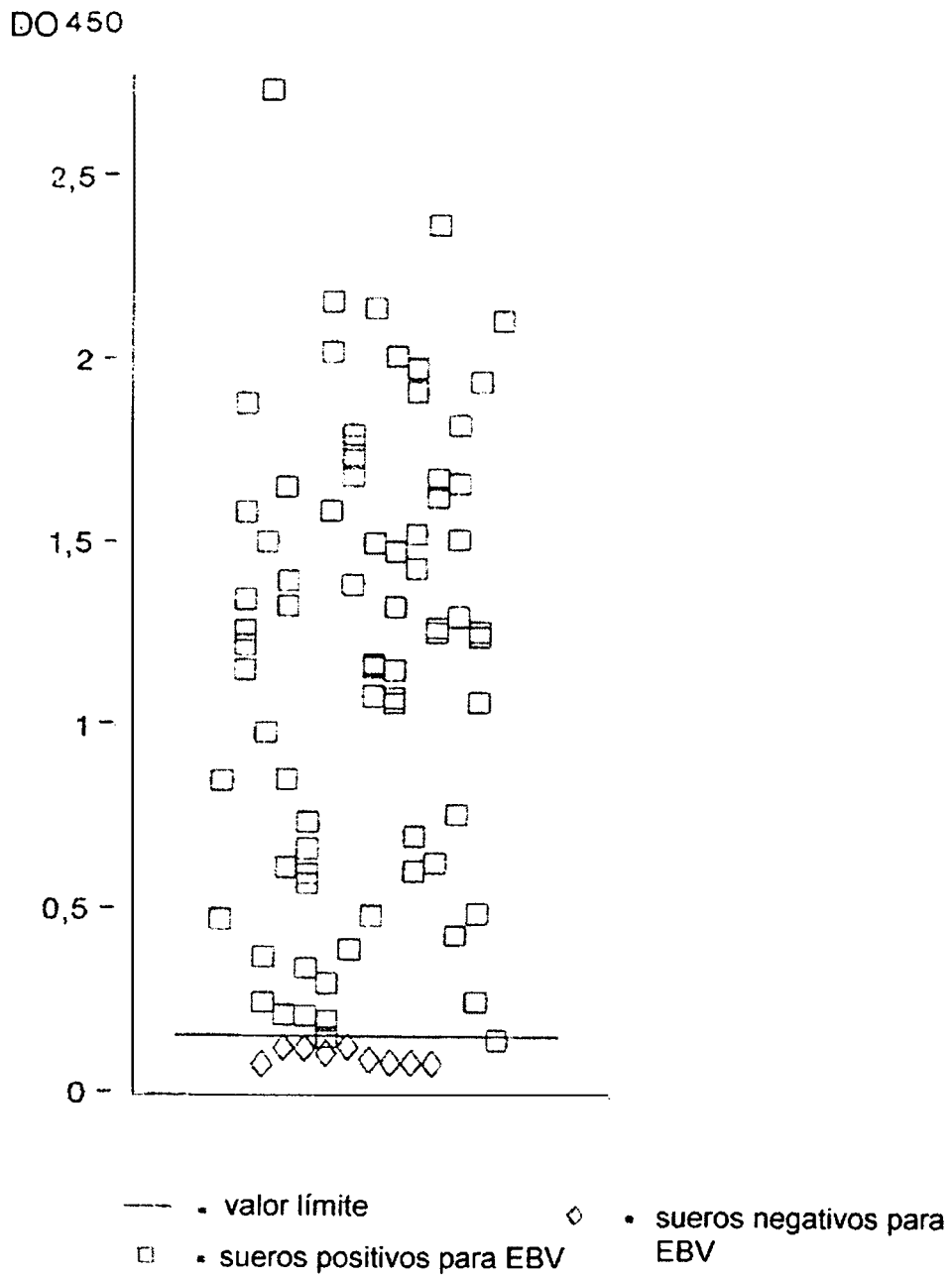
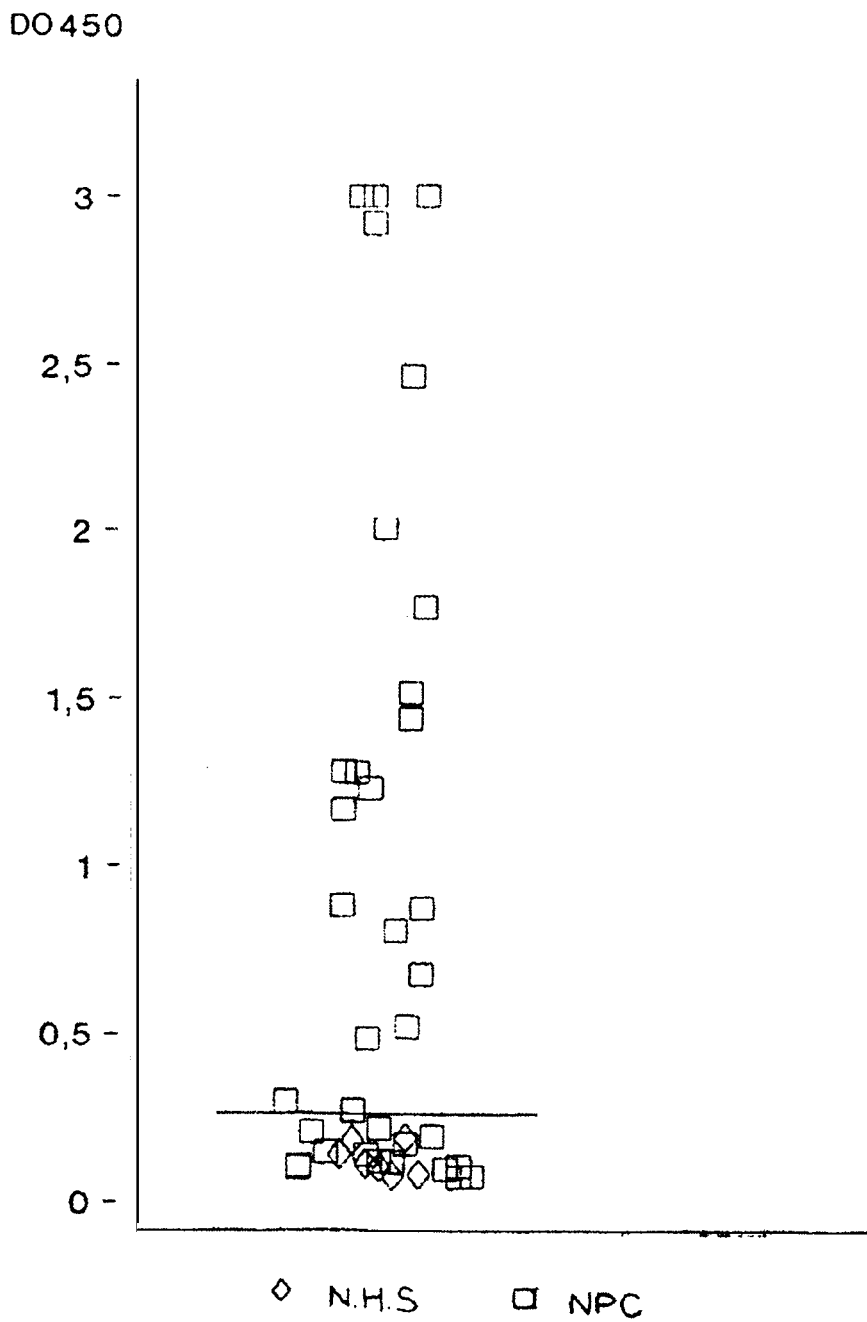


FIGURA 8C

IgA con el péptido VCA-p18
(35 sueros de pacientes de NPC (Hong-Kong))



ES 2 298 325 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Organon Teknika B.V.
 - (B) CALLE: Boseind 15
 - (C) CIUDAD: Boxtel
 - 10 (E) PAÍS: Países Bajos
 - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 5281 RM
- 15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Péptidos y secuencias de ácidos nucleicos relacionadas con el virus Epstein-Barr
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 22
- (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 20 (A) TIPO DE MEDIO: disquete
 - (B) ORDENADOR: IBM compatible con PC
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - 25 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión # 1.25 (EPO)

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 538 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: doble
 - 35 (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 40 (A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 1:
- 45 **CATGATGGCA CGCCGGCTGC CCAAGCCCAC CCTCCAGGGG AGGCTGGAGG CGGATTTTCC 60**
- AGACAGTCCC CTGCTTCCTA AATTTCAAGA GCTGAACCAG AATAATCTCC CCAATGATGT 120**
- TTTTCGGGAG GCTCAAAGAA GTTACCTGGT ATTTCTGACA TCCCAGTTCT GCTACGAAGA 180**
- 50 **GTACGTGCAG AGGACTTTTG GGGTGCCTCG GCGCCAACGC GCCATAGACA AGAGGCAGAG 240**
- AGCCAGTGTG GCTGGGGCTG GTGCTCATGC ACACCTTGGC GGGTCATCCG CCACCCCGT 300**
- 55 **CCAGCAGGCT CAGGCCGCCG CATCCGCTGG GACCGGGGCC TTGGCATCAT CAGCGCCGTC 360**
- CACGGCCGTA GCCCAGTCCG CGACCCCTC TGTTCCTTCA TCTATTAGCA GCCTCCGGGC 420**
- 60 **CGCGACTTCG GGGGCGACTG CCGCCGCTC CGCCGCCGCA GCCGTCGATA CCGGGTCAGG 480**
- TGGCGGGGA CAACCCACG ACACCGCCCC ACGCGGGCA CGTAAGAAAC AGTAGCCC 538**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 298 325 T3

(A) LONGITUD: 176 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 2

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1038 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 3:

ES 2 298 325 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35

ATGCTATCAG GTAACGCAGG AGAAGGAGCA ACAGCCTGCG GAGGTTTCGGC CGCCGCGGGC 60
 CAGGACCTCA TCAGCGTCCC CCGCAACACC TTTATGACAC TGCTTCAGAC CAACCTGGAC 120
 AACAAACCGC CGAGGCAGAC CCCGCTACCC TACGCGGGCC CGCTGCCCCC CTTTTCCCAC 180
 CAGGCAATAG CCACCGCGCC TTCCTACGGT CCTGGGGCCG GAGCGGTTCGC CCCGGCCGGC 240
 GGCTACTTTA CCTCCCCAGG AGGTTACTAC GCCGGGCCCC CGGGCGGGGA CCCGGGTGCC 300
 TTCTTGGCGA TGGACGCTCA CACCTACCAC CCCCACCCAC ACCCCCCTCC GGCCTACTTT 360
 GGCTTGCCGG GCCTCTTTGG CCCCCCTCCA CCCGTGCCTC CTTACTACGG ATCCCCTTG 420
 CGGGCAGACT ACGTCCCCGC TCCCTCGCGA TCCAACAAGC GGAAAAGAGA CCCCAGGAG 480
 GATGAAGAAG GCGGGGGGCT ATTCCCGGGG GAGGACGCCA CCCTCTACCG CAAGGACATA 540
 GCGGGCCTCT CCAAGAGTGT GAATGAGTTA CAGCACACGC TACAGGCCCT GCGCCGGGAG 600
 ACGCTGTCCT ACGGCCACAC CGGAGTCGGA TACTGCCCCC AGCAGGGCCC CTGCTACACC 660
 CACTCGGGGC CTTACGGAIT TCAGCCTCAT CAAAGCTACG AAGTGCCAG ATACGTCCCT 720
 CATCCGCCCC CACCACCAAC TTCTCACCAG GCAGCTCAGG CGCAGCCTCC ACCCCCGGGC 780
 ACACAGGGCC CCGAAGCCCA CTGTGTGGCC GAGTCCACGA TCCCTGAGGC GGGAGCAGCC 840
 GGGAACTCTG GACCCCGGGA GGACACCAAC CCTCAGCAGC CCACCACCGA GGGCCACCAC 900
 CGCGGAAAGA AACTGGTGCA GGCCTCTGCG TCCGGAGTGG CTCAGTCTAA GGAGCCCACC 960
 ACCCCCAAGG CCAAGTCTGT GTCAGCCCAC CTCAAGTCCA TCTTTTGCGA GGAATTGCTG 1020
 AATAAACGCG TGGCTTGA 1038

40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 345 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 4:

60

65

ES 2 298 325 T3

1 Met Leu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Gly Ala Thr Ala Cys Gly Gly Ser
 5 Ala Ala Ala Gly Gln Asp Leu Ile Ser Val Pro Arg Asn Thr Phe Met
 10 Thr Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asn Lys Pro Pro Arg Gln Thr Pro
 15 Leu Pro Tyr Ala Ala Pro Leu Pro Pro Phe Ser His Gln Ala Ile Ala
 20 Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Pro Gly Ala Gly Ala Val Ala Pro Ala Gly
 25 Gly Tyr Phe Thr Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Pro Ala Gly Gly
 30 Asp Pro Gly Ala Phe Leu Ala Met Asp Ala His Thr Tyr His Pro His
 35 Pro His Pro Pro Pro Ala Tyr Phe Gly Leu Pro Gly Leu Phe Gly Pro
 40 Pro Pro Pro Val Pro Pro Tyr Tyr Gly Ser His Leu Arg Ala Asp Tyr
 45 Val Pro Ala Pro Ser Arg Ser Asn Lys Arg Lys Arg Asp Pro Glu Glu
 50 Asp Glu Glu Gly Gly Gly Leu Phe Pro Gly Glu Asp Ala Thr Leu Tyr
 55 Arg Lys Asp Ile Ala Gly Leu Ser Lys Ser Val Asn Glu Leu Gln His
 60 Thr Leu Gln Ala Leu Arg Arg Glu Thr Leu Ser Tyr Gly His Thr Gly
 65 Val Gly Tyr Cys Pro Gln Gln Gly Pro Cys Tyr Thr His Ser Gly Pro
 70 Tyr Gly Phe Gln Pro His Gln Ser Tyr Glu Val Pro Arg Tyr Val Pro
 75 His Pro Pro Pro Pro Pro Thr Ser His Gln Ala Ala Gln Ala Gln Pro
 80 Pro Pro Pro Gly Thr Gln Ala Pro Glu Ala His Cys Val Ala Glu Ser

ES 2 298 325 T3

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 7:

Gly Val Pro Arg Arg Gln Arg Ala Ile Asp Lys Arg Gln Arg Ala
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 8:

Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 9:

Thr Ala Val Ala Gln Ser Ala Thr Pro Ser Val Ser
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 298 325 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 10:

Pro Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 11:

Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 12:

Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 13:

ES 2 298 325 T3

Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 14:

Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala Thr
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 15:

Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala Thr Ala Ala Ala Ser
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 16:

Ala Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 298 325 T3

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 17:

Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 18:

Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro His
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 19:

Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro His Asp
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 298 325 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 20:

Gly Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 21:

Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: virus Epstein-Barr

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 22:

Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg Lys
1 5 10