

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b><br><b>C07K 7/00</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>A2</b> | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 99/62938</b><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 9. Dezember 1999 (09.12.99)                                                                                                                                     |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/03719<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 28. Mai 1999 (28.05.99)<br><br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>198 24 244.1      29. Mai 1998 (29.05.98)      DE<br><br><b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> SCHATZ, Octavian [DE/DE];<br>Steinbergstrasse 30, D-85250 Altomünster (DE). HAAS,<br>Jürgen [DE/DE]; Brunellenweg 39, D-80689 München<br>(DE).<br><br><b>(74) Anwalt:</b> VOSSIUS & PARTNER; P.O. Box 86 07 67, D-81634<br>München (DE).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |           | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, JP, US, europäisches Patent<br>(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,<br>LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu<br/>veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> |
| <b>(54) Title:</b> NOVEL (POLY)PEPTIDES WHICH REPRESENT THE EPITOPES OF THE HUMAN HERPES VIRUS TYPE 8<br><br><b>(54) Bezeichnung:</b> NEUE (POLY)PEPTIDE, DIE EPITOPE DES HUMANEN HERPESVIRUS 8 DARSTELLEN<br><br><b>(57) Abstract</b><br><br>The invention relates to (poly)peptides which are recognized by anti-human herpes virus type 8 (HHV8) antibodies of patients infected with HHV8, whereby these (poly)peptides are not naturally occurring HHV8 proteins. The invention also relates to polymers comprising at least two of the same or different inventive peptides, and to conjugates which comprise the inventive peptides and/or polymers. Additionally, the invention relates to mixtures which comprise the inventive peptides and/or polymers and which are used in the method in order to detect anti-HHV8 antibodies in a very sensitive and specific manner. The invention provides a diagnostic kit which comprises the inventive peptides, polymers and/or mixtures and which can be used to detect anti-HHV8 antibodies or to diagnose an HHV8 infection.<br><br><b>(57) Zusammenfassung</b><br><br>Die vorliegende Erfindung betrifft (Poly)peptide, die von anti-HHV8 Antikörpern HHV8-infizierter Patienten erkannt werden, wobei diese (Poly)peptide nicht natürlich vorkommende HHV8-Proteine sind. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Polymere, umfassend mindestens zwei gleiche oder verschiedene erfindungsgemäße Peptide, sowie Konjugate, die die erfindungsgemäßen Peptide und/oder Polymere umfassen. Des weiteren sind Gemische beschrieben, die die erfindungsgemäßen Peptide und/oder Polymere umfassen und in Verfahren eingesetzt werden, um sehr sensitiv und spezifisch anti-HHV8 Antikörper nachzuweisen. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung einen diagnostischen Kit, der die erfindungsgemäßen Peptide, Polymere und/oder Gemische umfaßt und zum Nachweis von anti-HHV8 Antikörpern bzw. zur Diagnose einer HHV8-Infektion eingesetzt werden kann. |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                   |    |                                                 |    |                                |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|-------------------------------------------------|----|--------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                           | LS | Lesotho                                         | SI | Slowenien                      |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                          | LT | Litauen                                         | SK | Slowakei                       |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                        | LU | Luxemburg                                       | SN | Senegal                        |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                             | LV | Lettland                                        | SZ | Swasiland                      |
| AZ | Aserbaidshan                 | GB | Vereinigtes Königreich            | MC | Monaco                                          | TD | Tschad                         |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                          | MD | Republik Moldau                                 | TG | Togo                           |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                             | MG | Madagaskar                                      | TJ | Tadschikistan                  |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                            | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                   |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                      | ML | Mali                                            | TR | Türkei                         |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                            | MN | Mongolei                                        | TT | Trinidad und Tobago            |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                            | MR | Mauretanien                                     | UA | Ukraine                        |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                            | MW | Malawi                                          | UG | Uganda                         |
| BY | Belarus                      | IS | Island                            | MX | Mexiko                                          | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                           | NE | Niger                                           | UZ | Usbekistan                     |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                             | NL | Niederlande                                     | VN | Vietnam                        |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                             | NO | Norwegen                                        | YU | Jugoslawien                    |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                       | NZ | Neuseeland                                      | ZW | Zimbabwe                       |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen                                           |    |                                |
| CM | Kamerun                      | KR | Republik Korea                    | PT | Portugal                                        |    |                                |
| CN | China                        | KZ | Kasachstan                        | RO | Rumänien                                        |    |                                |
| CU | Kuba                         | LC | St. Lucia                         | RU | Russische Föderation                            |    |                                |
| CZ | Tschechische Republik        | LI | Liechtenstein                     | SD | Sudan                                           |    |                                |
| DE | Deutschland                  | LK | Sri Lanka                         | SE | Schweden                                        |    |                                |
| DK | Dänemark                     | LR | Liberia                           | SG | Singapur                                        |    |                                |
| EE | Estland                      |    |                                   |    |                                                 |    |                                |

## **NEUE (POLY)PEPTIDE, DIE EPITOPE DES HUMANEN HERPESVIRUS 8 DARSTELLEN**

Die vorliegende Erfindung betrifft (Poly)peptide, die von anti-HHV8 Antikörpern HHV8-infizierter Patienten erkannt werden, wobei diese (Poly)peptide nicht natürlich vorkommende HHV8-Proteine sind. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Polymere, umfassend mindestens zwei gleiche oder verschiedene erfindungsgemäße Peptide, sowie Konjugate, die die erfindungsgemäßen Peptide und/oder Polymere umfassen. Desweiteren sind Gemische beschrieben, die die erfindungsgemäßen Peptide und/oder Polymere umfassen und in Verfahren eingesetzt werden, um sehr sensitiv und spezifisch anti-HHV8 Antikörper nachzuweisen. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung einen diagnostischen Kit, der die erfindungsgemäßen Peptide, Polymere und/oder Gemische umfaßt und zum Nachweis von anti-HHV8 Antikörpern bzw. zur Diagnose einer HHV8-Infektion eingesetzt werden kann.

Das humane Herpesvirus 8 (HHV8) ist das mutmaßliche ätiologische Agens des Kaposi Sarkoms und bestimmter B-Zell Lymphome. Das Kaposi Sarkom (KS) ist der weitaus häufigste Tumor bei AIDS Patienten. Man schätzt, daß 20 bis 30% aller Patienten im Laufe ihrer HIV Infektion an KS erkranken. In den U.S.A. ist die Inzidenz damit 20.000 x höher als in der Gesamtpopulation (1). In manchen geografischen Regionen, wie z.B. in den Ländern des Mittelmeerraums oder Afrika liegt die Gesamtinzidenz deutlich höher. AIDS-assoziiertes KS ist durch einen aggressiven Verlauf und hohe Mortalität gekennzeichnet, während der Krankheitsverlauf beim klassischen KS meist relativ indolent und langsam progredient ist. Weitere Formen dieser Erkrankung sind das sogenannte "endemische" KS, das vor allem bei Kindern und jugendlichen Erwachsenen in Afrika südlich der Sahara auftritt sowie das iatrogene KS bei immunsupprimierten Transplantationsempfängern.

KS wurde erstmals vor mehr als 100 Jahren als ein relativ seltener Tumor beschrieben, der vor allem bei älteren Männern mediterranen oder osteuropäischen Ursprungs auftrat (2). Äußerlich manifestiert sich KS durch scharf umgrenzte, noduläre Läsionen der Haut meist im Bereich der Extremitäten; die Läsionen werden aber auch an den Schleimhäuten und Viszera beobachtet. Charakteristisches histologisches Merkmal

dieser Läsionen ist die Präsenz länglicher, spindelförmiger Zellen vermutlich endothelialen Ursprungs. Darüber hinaus findet man eine Anzahl weiterer Zelltypen wie Monozyten, Fibroblasten, neovaskuläre Strukturen und extravasale Erythrozyten. Im Tumorgewebe ist die Produktion von VEGF (vascular endothelial growth factor) signifikant erhöht; dies hat eine andauernde Angiogenese und somit eine extreme Vaskularisierung zur Folge.

Epidemiologische Untersuchungen ergaben schon vor einigen Jahren Hinweise auf die Beteiligung eines infektiösen Agens (1, 3). Mittels einer neuen PCR Technik wurden 1994 in Biopsiematerial von KS Läsionen Sequenzen eines bis dato noch unbekannten humanen  $\gamma$ 2-Herpesvirus gefunden (4). Das dazugehörige Virus wurde KSHV (Kaposi Sarkom assoziiertes Herpesvirus) oder HHV8 (Humanes Herpesvirus 8) genannt. Das 140 kb große Genom ist vor kurzem kloniert und sequenziert worden (5).

Aufgrund einer ganzen Reihe von Arbeiten besteht heute kein Zweifel mehr daran, daß das Auftreten eines Kaposi Sarkoms gleich welcher Form zu praktisch 100% mit der Präsenz von HHV8 in den Läsionen korreliert ist (6-11). Der PCR Nachweis von HHV8 DNA ist zudem ein prognostisches Indiz für die spätere Entwicklung eines Kaposi Sarkoms (12). Unsere eigenen Arbeiten zeigen, daß eine Serokonversion im Mittel bereits 2 Jahre vor dem Auftreten eines Kaposi Sarkoms nachweisbar ist.

Wahrscheinlich ist HHV8 auch an der Pathogenese bestimmter Lymphome wie etwa Castleman's Disease oder PEL (Primary Effusion Lymphoma) beteiligt (13, 14). Darüber hinaus gibt es Hinweise, daß HHV8 auch bei interstitieller Pneumonie und Enzephalitis eine Rolle spielen könnte (15). Schließlich wurde in einer kürzlich publizierten Arbeit eine Korrelation zwischen dem Auftreten von HHV8 und multiplen Myelomen postuliert (16). Obwohl verschiedene experimentelle Befunde (17-22) die Hypothese stützen, daß HHV8 in die Pathogenese dieser Krankheiten involviert sein könnte, ist ein kausaler Zusammenhang bislang noch nicht endgültig bewiesen. In manchen Regionen (z.B. in Zentralafrika) scheint HHV8 nämlich auch in der Gesamtbevölkerung relativ weit verbreitet zu sein (6, 8, 23, 24). Trotz einer erhöhten Inzidenz des Kaposi Sarkoms in diesen Ländern scheint das Vorliegen einer Infektion mit HHV8 alleine ein zwar notwendiges, aber nicht hinreichendes Kriterium für die Entwicklung der Krankheit zu sein.

Anhand der gefundenen viralen DNA Fragmente wurden verschiedene diagnostische Verfahren entwickelt, die sowohl einen direkten als auch einen indirekten Nachweis von

HHV8 erlauben. Durch einen relativ einfachen Test, der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), können selbst sehr geringe Mengen viraler DNA in Blut- oder Gewebeproben bestimmt werden (25-28). Allerdings ist auch dieser Test für manche medizinisch relevanten Untersuchungen nicht sensitiv genug.

Künstlich immunsupprimierte Organtransplantierte entwickeln ebenfalls überdurchschnittlich häufig ein Kaposi Sarkom (bei Nierentransplantationen bis zu 5%), wobei die Zahl der Fälle stark je nach geografischer Herkunft variiert. So ist das KS in den Ländern des Nahen und Mittleren Ostens der häufigste Posttransplantationstumor und liegt weltweit an 3. Stelle. In den Industrieländern (Europa, Japan, U.S.A.) haben insgesamt 1-1,5 Millionen Menschen ein erhöhtes Risiko, an KS zu erkranken. Für diese Personen bestimmte Blutpräparate sollten daher sicherheitshalber unbedingt auf HHV8 Antikörper (als Indiz für eine mögliche Verseuchung mit HHV8) getestet werden, um deren Infektionsrisiko so gering wie möglich zu halten. Im erweiterten Sinn trifft dies auch andere Personenkreise, bei denen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Beeinträchtigung des Immunsystems vorliegt, beispielsweise Patienten, die eine Chemotherapie erhalten, Dialysepatienten, ältere Patienten, Neonate etc.

Da KS hauptsächlich Personen mit einer Immunschwäche gleich welcher Art betrifft und nur mit mäßigem Erfolg chemotherapeutisch, chirurgisch oder mit ionisierenden Strahlen behandelbar ist (es gibt derzeit weder eine kausale Therapie noch eine endgültige Heilung für diese Krankheit), muß man davon ausgehen, daß immundefiziente Personen durch die Verabreichung HHV8-kontaminierter Blutpräparate einem besonderen Risiko ausgesetzt sind, ein Kaposi Sarkom zu entwickeln.

In der Routinediagnostik kommen meist sogenannte ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)-Testverfahren zum Einsatz, da sie sehr billig sind und sich auch für hohe Probenaufkommen eignen. Der Nachweis von HHV8-spezifischen Antikörpern im Serum ist ein Indiz für einen (früheren) Kontakt mit dem Antigen. Dieser kann unter Umständen auch dann noch positiv ausfallen, wenn die Menge an viraler DNA unterhalb der Nachweisgrenze der PCR liegt. Die Anwesenheit HHV8 spezifischer Antikörper kann außer mit dem ELISA (31-33) auch mittels indirektem Fluoreszenzassay (IFA) (24) und Western-Blot (29, 30) untersucht werden.

Allerdings sind die bislang beschriebenen Verfahren entweder sehr zeitaufwendig (IFA bzw. Western-Blot) oder nicht sensitiv genug (PCR aus Blutproben, ELISA mit herkömmlichen Antigenen).

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem war somit, Reagenzien zur Verfügung zu stellen, deren Einsatz einen sehr sensitiven und spezifischen Nachweis von anti-HHV8 Antikörpern ermöglicht.

Dieses technische Problem wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Dementsprechend betrifft die vorliegende Erfindung ein (Poly)peptid, das von anti-HHV8 Antikörpern HHV8-infizierter Patienten erkannt wird und dadurch gekennzeichnet ist, daß es

- (a) eine der in SEQ ID NR.: 1 bis 8 gekennzeichneten Aminosäuresequenzen umfaßt;
- (b) aus einer der in SEQ ID NR.: 1 bis 8 gekennzeichneten Aminosäuresequenzen besteht; oder
- (c) aus einer Aminosäuresequenz besteht, die von einer der in (a) oder (b) gekennzeichneten Aminosäuresequenzen durch eine oder mehrere Substitutionen, Deletionen und/oder Insertionen abweicht;

wobei das (Poly)peptid kein natürlich vorkommendes HHV8-Protein ist.

Natürlich vorkommende HHV8-Proteine im Sinne dieser Erfindung sind solche HHV8-Proteine, die die vollständige Aminosäuresequenz aufweisen und nicht degradiert sind. Üblicherweise oder vorzugsweise wird das (Poly)peptid von anti-HHV8 Antikörpern in Körperflüssigkeiten von HHV8-infizierten Patienten erkannt. Methoden zur Bestimmung der antigenen Eigenschaft des erfindungsgemäßen (Poly)peptids mittels anti-HHV8 Antikörper sowie Methoden zu deren Isolierung, vorzugsweise aus Körperflüssigkeiten HHV8-infizierter Patienten, sind dem Fachmann bekannt und umfassen beispielsweise den ELISA.

Der Begriff "Körperflüssigkeiten" umfaßt im Sinne der vorliegenden Erfindung z.B. Blut, Serum, Lymphe, Gewebeflüssigkeit und Gewebeextrakte z.B. aus Mucosae respiratorischen, urogenitalen oder gastrointestinalen Ursprungs. Desweiteren umfaßt dieser Begriff Körperflüssigkeiten, die derart behandelt bzw. vorbereitet wurden, daß sie z.B. für den Einsatz in den oben erwähnten Methoden geeignet sind. Beispiele hierfür sind in vitro verdünnte Seren, mit Konservierungsstoffen (wie z.B. vor Kälte schützende

Substanzen) versetzte Körperflüssigkeiten oder mit gerinnungshemmenden Stoffen (z.B. Heparin) behandelte Körperflüssigkeiten.

Der Begriff "(Poly)peptid", wie erfindungsgemäß verwendet, umfaßt sowohl Peptide als auch Polypeptide. Erfindungsgemäße (Poly)peptide, die eine der in SEQ ID NR.: 1 bis 8 gekennzeichneten Aminosäuresequenzen umfassen, können beispielsweise von einer HHV8-Sequenz und/oder einer anderen Sequenz flankiert sein, die nicht von HHV8 abstammt. Wie oben bereits erwähnt, ist das erfindungsgemäße (Poly)peptid jedoch kein natürlich vorkommendes HHV8-Protein, d.h. das erfindungsgemäße (Poly)peptid stellt kein volle-Länge-HHV8-Protein dar, wie es von HHV8-Genomen codiert wird.

Vorzugsweise stellen die erfindungsgemäßen (Poly)peptide lineare Epitope verschiedener kodierender Regionen der HHV8-Genoms dar und besitzen eine Länge von vorzugsweise höchstens 50 Aminosäuren. Stärker bevorzugt ist eine Länge von höchstens 15 Aminosäuren, und am meisten bevorzugt ist eine Länge der erfindungsgemäßen (Poly)peptide von 10 oder 12 Aminosäuren.

Der Begriff "Substitution" umfaßt im Sinne der vorliegenden Erfindung sowohl konservative als auch nicht-konservative Aminosäureaustausche. Unter konservative Aminosäureaustausche fallen solche, bei denen beispielsweise eine neutrale, hydrophobe, eine neutrale, polare, eine basische oder eine saure Aminosäure durch eine Aminosäure derselben Klasse ersetzt wird. Dem Fachmann sind die verschiedenen Klassen von Aminosäuren, deren Klassenzugehörigkeit durch die spezifischen Seitengruppen bestimmt ist, wohl bekannt. Wesentlich dabei ist, daß die dreidimensionale Struktur der (Poly)peptide nicht derart verändert wird, daß sie von anti-HHV8 Antikörpern nicht mehr erkannt werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide wurden in einem Screening von ca. 3000 Peptiden identifiziert, das nach folgenden Kriterien durchgeführt wurde:

- (a) Minimale Homologie mit Peptiden bekannter Proteine, vor allem mit entsprechenden Epitopen verwandter Herpesviren wie z.B. EBV und CMV; und
- (b) Maximale Antigenität (laut Computervorhersage).

Eine Vorselektion möglicherweise immundominanter, HHV8-spezifischer Peptide wurde durch den Einsatz einer vorteilhaften Kombination verschiedener Computerprogramme (BLASTP, ANTIGENIC und BLASTALIGN) der Genetics Computer Group (GCG), Wisconsin durchgeführt.

Alle Peptide, die in dieser Vorselektion ausgewählt wurden (292 Peptide), wurde dann einzeln mit einem Serumpool von KS Patienten und verschiedenen Kontrollpools von gesunden Probanden analysiert.

Die aus diesem Initialscreen hervorgegangen Peptide wurden daraufhin an mehreren hundert Seren von KS Patienten und Kontrollen getestet, wobei spezielles Augenmerk darauf gerichtet wurde, ob Kreuzreaktionen mit EBV-, CMV- oder HSV spezifischen Antikörpern auftraten.

Durch diese mehrfachen Tests wurden die erfindungsgemäßen Peptide, die das gewünschte Reaktionsprofil aufwiesen, identifiziert.

Die erfindungsgemäßen (Poly)peptide umfassen auch durch Peptidomimetics hergestellte Verbindungen, vorzugsweise (Poly)peptide, die den vorgenannten (Poly)peptiden in den immunologischen/diagnostischen Eigenschaften entsprechen. Dem Fachmann ist bekannt, wie solche Moleküle z.B. unter Verwendung von L- und D-Aminosäuren entworfen und hergestellt werden (z.B. Banerjee, Biopolymers 39 (1996), 769-777).

Vorzugsweise betrifft die vorliegende Erfindung ein Peptidmix, welcher aus einer Kombination erfindungsgemäßer (Poly)peptide besteht.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt der Peptidmix die (Poly)peptide mit den in SEQ ID NR.: 1, 3, 4 und 8 gekennzeichneten Aminosäuresequenzen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält der erfindungsgemäße Peptidmix diese (Poly)peptide in einem molaren Verhältnis von 1:1:1:1.

Unter Verwendung des erfindungsgemäßen Peptidmixes können anti-HHV8 Antikörper in besonders vorteilhafter Weise nachgewiesen werden, wobei dieser Nachweis überraschenderweise sowohl die Empfindlichkeit als auch die Spezifität herkömmlicher Nachweisverfahren weit übertrifft (siehe unten).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das (Poly)peptid, das eine Aminosäuresequenz umfaßt, die von einer der in (a) gekennzeichneten Aminosäuresequenzen durch eine oder mehrere Substitutionen, Deletionen und/oder Insertionen abweicht, eine natürlich vorkommende Sequenzvariante.

Solche Peptide, die Sequenzvarianten der entsprechenden Positionen im Genom von HHV8 (5) darstellen, können die Sensitivität des Nachweises noch weiter erhöhen. Die Spezifität bleibt dabei erhalten, da die Auswahl der Peptide, unter anderem nach minimaler Homologie zu bekannten (viralen) Proteinen, hochkonservierte Bereiche von vornherein ausschließt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Polymer, das mindestens zwei gleiche oder verschiedene erfindungsgemäße (Poly)peptide umfaßt.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen die Polymere Homopolymere, bestehend aus mehreren Exemplaren eines einzigen erfindungsgemäßen (Poly)peptids, als auch Heteropolymere aus einer beliebigen Kombination der erfindungsgemäßen (Poly)peptide, wobei solche Heteropolymere auch mehrere Exemplare eines erfindungsgemäßen (Poly)peptids enthalten können.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Polymer durch eine unverzweigte Kette von polymerisierten erfindungsgemäßen (Poly)peptiden gekennzeichnet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Polymer durch verzweigte Ketten von polymerisierten erfindungsgemäßen (Poly)peptiden gekennzeichnet.

Polymere mit verzweigten Ketten von polymerisierten (Poly)peptiden werden z.B. durch Verknüpfung der (Poly)peptide über eine Aminosäure oder ein Aminosäure-Analogon hergestellt, die/das zwei Aminogruppen und eine Carboxylgruppe besitzen, wobei jede Gruppe fähig ist, eine Peptidbindung zu bilden. Dem Fachmann sind solche Syntheseverfahren bekannt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Polymere, die die Peptide mit den in SEQ ID NR.: 1, 3, 4 und 8 gekennzeichneten Aminosäuresequenzen umfassen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße (Poly)peptid oder das erfindungsgemäße Polymer chemisch synthetisiert.

Synthese-Verfahren zur chemischen Herstellung von Peptiden mittels Peptid-Synthesizer sind dem Fachmann bekannt.

Vorzugsweise betrifft die vorliegende Erfindung auch Gemische bestehend aus den erfindungsgemäßen Polymeren.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einer weiteren Ausführungsform ein Fusionsprotein, das ein erfindungsgemäßes (Poly)peptid oder ein erfindungsgemäßes Polymer umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Polynukleotid, das ein erfindungsgemäßes (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein codiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Polynukleotid DNA oder RNA.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin einen Vektor, der ein erfindungsgemäßes Polynukleotid umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Vektor ein Expressionsvektor.

Der Begriff "Expressionsvektor" umfaßt im Sinne der vorliegenden Erfindung sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Expressionsvektoren. Die notwendigen regulatorischen Elemente zur Expression eines (Poly)peptids sind dem Fachmann wohl bekannt und können den Expressionsbedingungen entsprechend ausgewählt werden. Der Begriff "Expression" kann dabei Transkription als auch Transkription und Translation bedeuten. Regulatorische Elemente umfassen dabei insbesondere

Promotoren. Für die Expression eines erfindungsgemäßen Polynucleotids in prokaryontischen Zellen stehen eine Reihe von Promotoren zur Verfügung, z.B. der E. coli lac- oder trp-Promotor, der P<sub>R</sub>- oder P<sub>L</sub>-Promotor des Lambda-Phagen, lacI, lacZ, T3, T7, gpt, etc. Eukaryontische Promotoren sind beispielsweise der CMV immediate early-Promotor, der HSV-Promotor, der Thymidinkinase-Promotor, der SV40-Promotor, der LTRs von Retroviren und der Maus Metallothionin-I-Promotor. Es ist bereits eine Vielzahl von Expressionsvektoren für die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen beschrieben, z.B. für Eukaryonten pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) oder GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA), pSV2CAT, pOG44 und für Prokaryonten pQE70, pQE60, pBluescript SK, etc. Neben Promotoren können erfindungsgemäße Vektoren auch Elemente zur weiteren Steigerung der Transkription enthalten, wie z.B. sogenannte Transkriptions-Enhancer. Beispiele dafür sind der SV40-Enhancer, der Polyoma-Enhancer, der Cytomegalovirus early Promoter-Enhancer und Adenovirus-Enhancer.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Wirtszelle, die einen erfindungsgemäßen Vektor enthält.

Unter den Begriff "Wirtszelle" fallen erfindungsgemäß sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Wirtszellen. Bevorzugte prokaryontische Wirtszellen umfassen z.B. E. coli-Zellen, Streptomyces-, Bacillus- oder Salmonella-Zellen. Bevorzugte eukaryontische Wirtszellen umfassen Pilzzellen, z.B. Hefezellen, insbesondere Saccharomyces cerevisiae-Zellen, Insektenzellen wie z.B. Drosophila- oder SF9-Zellen, tierische Zellen wie z.B. CHO- oder COS-Zellen, Pflanzenzellen oder Säugerzellen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (Poly)peptids, Polymers oder Fusionsproteins, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Züchtung der erfindungsgemäßen Wirtszelle unter Bedingungen, die die Expression des (Poly)peptids, des Polymers oder des Fusionsproteins bewirken;  
oder
- (b) in vitro Transkription und/oder Translation des erfindungsgemäßen Polynukleotids;

und Gewinnung des in (a) oder (b) hergestellten (Poly)peptids, Polymers oder Fusionsproteins.

Die Bedingungen, die eine Expression eines (Poly)peptids bewirken sind dem Fachmann bekannt und können entsprechend der verwendeten Wirtszelle und des eingesetzten Expressionsvektors gewählt werden. Entsprechend gestaltet sich auch die Gewinnung des Expressionsproduktes. Wird z.B. ein Expressionsvektor eingesetzt, der zur Sekretion des synthetisierten (Poly)peptids führt, wird das (Poly)peptid aus dem Kulturüberstand gewonnen. Findet die Expression intrazellulär statt, wird das Expressionsprodukt aus der Wirtszelle isoliert.

Methoden zur in vitro Transkription und/oder Translation sind dem Fachmann ebenfalls wohl bekannt. Beispielsweise lassen sich solche Verfahren mittels kommerzieller Kits entsprechend den Instruktionen des Herstellers durchführen.

Vorzugsweise werden bei der Gewinnung des erfindungsgemäßen (Poly)peptids, Polymers oder Fusionsproteins zusätzliche, dem Fachmann bekannte Reinigungsschritte, wie z.B. säulenchromatographische Verfahren, durchgeführt, um Verunreinigungen (z.B. zelluläre Proteine, Nucleinsäuren, Komponenten des in vitro Transkriptions-/Translations-Systems) weitestgehend zu entfernen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Konjugat, das ein erfindungsgemäßes (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein, oder ein (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein, hergestellt durch das erfindungsgemäße Verfahren, umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, die mindestens ein erfindungsgemäßes (Poly)peptid, und/oder ein erfindungsgemäßes Polymer, und/oder ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, und/oder ein (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein, hergestellt durch das erfindungsgemäße Verfahren, und/oder ein erfindungsgemäßes Konjugat umfaßt und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Zusammensetzung ein Arzneimittel.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Arzneimittel ein Impfstoff. In dieser Ausführungsform sind die Peptide, einzeln oder in Kombination, vorzugsweise an einen Carrier gekoppelt. Beispiele für geeignete Carrier sind Polystyrolkugeln, Streptavidin, BSA oder KLH.

Beispiele für geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger und/oder Verdünnungsmittel sind dem Fachmann bekannt und umfassen z.B. Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, wie z.B. Öl/Wasser-Emulsionen, verschiedene Arten von Netzmitteln oder Detergenzien, sterile Lösungen, etc. Arzneimittel, die solche Träger umfassen, können mittels bekannter konventioneller Methoden formuliert werden. Diese Arzneimittel können einem Individuum in einer geeigneten Dosis verabreicht werden. Die Verabreichung kann oral oder parenteral erfolgen, z.B. intravenös, intraperitoneal, subcutan, intramuskulär, lokal, intranasal, intrabronchial oder intradermal, oder über einen Katheter an einer Stelle in einer Arterie. Die Art der Dosierung wird vom behandelnden Arzt entsprechend den klinischen Faktoren bestimmt. Es ist dem Fachmann bekannt, daß die Art der Dosierung von verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie z.B. der Körpergröße bzw. dem Gewicht, der Körperoberfläche, dem Alter, dem Geschlecht oder der allgemeinen Gesundheit des Patienten, aber auch von dem speziell zu verabreichenden Mittel, der Dauer und Art der Verabreichung, und von anderen Medikamenten, die möglicherweise parallel verabreicht werden. Eine typische Dosis kann z.B. in einem Bereich zwischen 0,001 und 1000 µg liegen, wobei Dosen unterhalb oder oberhalb dieses beispielhaften Bereiches, vor allem unter Berücksichtigung der oben erwähnten Faktoren, vorstellbar sind. Im allgemeinen sollte sich bei regelmäßiger Verabreichung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung die Dosis in einem Bereich zwischen 1 µg- und 10 mg-Einheiten pro Tag befinden. Wird die Zusammensetzung intravenös verabreicht, was nicht bevorzugt empfohlen wird, um die Gefahr einer anaphylaktischen Reaktion zu minimieren, sollte sich die Dosis in einem Bereich zwischen 1 µg- und 10 mg-Einheiten pro Kilogramm Körpergewicht pro Minute befinden.

Die Zusammensetzung der Erfindung kann lokal oder systemisch verabreicht werden. Präparate für eine parenterale Verabreichung umfassen sterile wässrige oder nicht-wässrige Lösungen, Suspensionen und Emulsionen. Beispiele für nicht-wässrige Lösungsmittel sind Propylenglykol, Polyethylenglykol, pflanzliche Öle wie z.B. Olivenöl, und organische Esterverbindungen wie z.B. Ethyloleat, die für Injektionen geeignet

sind. Wäßrige Träger umfassen Wasser, alkoholisch-wäßrige Lösungen, Emulsionen, Suspensionen, Salzlösungen und gepufferte Medien. Parenterale Träger umfassen Natriumchlorid-Lösungen, Ringer-Dextrose, Dextrose und Natriumchlorid, Ringer-Laktat und gebundene Öle. Intravenöse Träger umfassen z.B. Flüssigkeits-, Nährstoff- und Elektrolyt-Ergänzungsmittel (wie z.B. solche, die auf Ringer-Dextrose basieren). Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann außerdem Konservierungsmittel und andere Zusätze umfassen, wie z.B. antimikrobielle Verbindungen, Antioxidantien, Komplexbildner und inerte Gase. Desweiteren können, abhängig von der beabsichtigten Verwendung, Verbindungen wie z.B. Interleukine, Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren, Interferone, chemotaktische Proteine oder ein unspezifisches immunmodulatorisches Agens enthalten sein.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von anti-HHV8 Antikörpern, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Inkontaktbringen einer biologischen Probe mit mindestens einem erfindungsgemäßen (Poly)peptid, und/oder einem erfindungsgemäßen Polymer, und/oder einem erfindungsgemäßen Fusionsprotein, und/oder einem (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein, hergestellt durch das erfindungsgemäße Verfahren, und/oder einem erfindungsgemäßen Konjugat, unter Bedingungen, die die Bindung von Antikörpern erlauben; und
- (b) Nachweis der in Schritt (a) gebunden Antikörper.

Neben dem Nachweis von anti-HHV8 Antikörpern eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren auch als prognostisches Indiz für die mögliche Entwicklung eines Kaposi Sarkoms bei HIV Infizierten bzw. Personen mit anderweitigen natürlichen oder iatrogenen Immundefekten.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird bei diesem Verfahren ein Gemisch der (Poly)peptide, die die in SEQ ID NR.:1, 3, 4 und 8 gekennzeichneten Aminosäuresequenzen umfassen, verwendet.

Die wesentlichen Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber bisher beschriebenen Verfahren (24, 29-34) sind einerseits die sehr hohe Sensitivität (>96% der Seren von KS Patienten reagieren positiv, während die meisten in der Literatur beschriebenen Verfahren lediglich eine Sensitivität von 35-85% erreichen) und andererseits eine sehr gute Spezifität und Reproduzierbarkeit (bei Verwendung der

ELISA-Technik zeigen Doppelbestimmungen als Resultat der gewählten Beschichtungstechnik eine durchschnittliche Abweichung von weniger als 5%).

Insbesondere wird durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Kombination verschiedener (Poly)peptide aus verschiedenen offenen Leserastern des viralen Genoms statt einzelner rekombinanter Antigene wie ORF65 (32) oder dem Minor Capsid Protein (33) ein größeres Spektrum von HHV8 spezifischen Antikörpern erkannt. Dies ist vor allem wichtig bei Seren von Patienten, bei denen bereits vor dem Erstkontakt mit HHV8 eine ausgeprägte Immundefizienz vorlag, da in diesen Fällen die Antikörpertiter oft sehr niedrig sind. Andere Peptid-basierte Immunoassays auf der Basis eines einzigen Peptids (31) erreichen eine weitaus geringere Sensitivität. Es ist zudem von anderen Herpesviren bekannt, daß die Verwendung eines einzelnen Epitops nicht ausreicht, um eine diagnostisch verwertbare Erkennungsquote von mindestens 90% aller positiven Seren zu erreichen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens sind die erfindungsgemäßen (Poly)peptide chemisch synthetisiert.

Durch die Verwendung chemisch synthetisierter Peptide anstelle rekombinanter Antigene, wie sie in anderen beschriebenen Verfahren benützt wurden, die auf der Verwendung prokaryontischer Expressionssystemen bzw. ungereinigter Viruslysate aus infizierten Zelllinien beruhen, ist somit eine Reaktion von nichtspezifischen Antikörpern (z.B. gegen *E. coli* Proteine aber vor allem auch gegen Proteine anderer humaner Herpesviren wie beispielsweise EBV oder CMV) praktisch ausgeschlossen. In den bisher beschriebenen Verfahren müssen hohe Ansprüche an die Aufreinigung des Antigens gestellt werden, da selbst geringste Mengen an Verunreinigungen mit z.B. *E. coli* Proteinen bei vielen Proben zu falschpositiven Resultaten führen können. Vorteilhafterweise erübrigen sich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zeit- und damit kostenaufwendige Aufreinigungsschritte wie z.B. vorherige Adsorption der Testseren (z.B. an *E. coli* Lysat).

Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen (Poly)peptide, und/oder Polymere, und/oder Fusionsproteine, und/oder Konjugate für den Einsatz in dem erfindungsgemäßen Verfahren biotinyliert. Die biotinylierten Komponenten werden dann über die hochspezifische Biotin-Streptavidin Interaktion an eine Streptavidin-beschichtete feste Phase gebunden. Dieses Kopplungsverfahren gewährleistet auch

bei Gemischen von erfindungsgemäßen (Poly)peptiden unterschiedlicher Ladung bzw. Hydrophilie eine gleichbleibende Beschichtung.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens umfaßt das Gemisch diese (Poly)peptide in einem molaren Verhältnis von 1:1:1:1.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Verfahren ein Enzym-gebundener Immunoabsorptionsassay (ELISA), ein Enzymimmunodotassay, ein Immunobead-Assay, ein passiver Hämagglutinations-Assay (PHA) oder ein Peptid-Antikörper-Peptid Sandwich-Assay.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die biologische Probe eine behandelte oder unbehandelte Form von Blut, Serum, Gewebeextrakt, Gewebeflüssigkeit, Zellkulturüberstand, oder Zellysat. Bezüglich des Begriffs "behandelte Form" wird auf die entsprechende oben erwähnte Definition des Begriffs "Körperflüssigkeiten" verwiesen, die die Möglichkeiten der Behandlung bzw. Vorbereitung betreffend auch in diesem Zusammenhang anzuwenden ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren den weiteren Schritt:

- (c) Nachweis von unspezifischen Bindungen, die von in der biologischen Probe zusätzlich vorhandenen Antikörpern in Schritt (a) verursacht werden.

Im Falle eines ELISAs können zusätzlich vorhandene Antikörper z.B. antigenunabhängig bzw. unspezifisch an die Oberfläche der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte binden und ein falsch-positives Signal bewirken. Falsch-positive Ergebnisse aufgrund unspezifischer Bindung an die Matrix werden durch individuelle Blankwerte sicher erkannt und eliminiert. Dies ist wichtig für den Einsatz im Screening von Blutbanken, um unnötiges Entfernen von Donorblut aufgrund falsch-positiver Ergebnisse für den HHV8 Nachweis zu vermeiden.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin einen Kit, enthaltend:

- (a) mindestens ein erfindungsgemäßes (Poly)peptid, und/oder ein erfindungsgemäßes Polymer, und/oder ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, und/oder ein (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein, hergestellt durch das erfindungsgemäße Verfahren, und/oder ein erfindungsgemäßes Konjugat, wobei

die Komponenten getrennt voneinander oder in Form eines Gemisches enthalten sind; und gegebenenfalls

- (b) eine feste Phase, an die mindestens ein erfindungsgemäßes (Poly)peptid, und/oder ein erfindungsgemäßes Polymer, und/oder ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, und/oder ein (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein, hergestellt durch das erfindungsgemäße Verfahren, und/oder ein erfindungsgemäßes Konjugat gebunden werden kann;
- (c) ein Probenverdünnungsmittel; und/oder
- (d) eine Negativkontrolle; und/oder
- (e) eine Positivkontrolle; und/oder
- (f) ein Reportermolekül.

Der Begriff "Reportermolekül" umfaßt im Sinne der vorliegenden Erfindung sowohl Enzyme wie z.B. Peroxidase oder alkalische Phosphatase (in diesen Fällen kann das verwendete Detektionssystem z.B. auf einer kolorimetrischen Reaktion beruhen, etwa der Umsetzung von ABTS durch eine Peroxidase), andere Enzyme, Radioisotope, Fluorophore, bioluminiszierende Moleküle, chemilumineszierende Moleküle oder dergleichen als auch deren Konjugate z.B. mit einem Zweitantikörper, der z.B. menschliche IgG- bzw. IgM-Antikörper erkennt.

Der erfindungsgemäße Kit kann zum Nachweis von anti-HHV8 Antikörpern und zur Diagnose von HHV8 Infektionen von Säugern vorzugsweise in Körperflüssigkeiten wie, z.B. Blut, Serum, Gewebeextrakten, Gewebeflüssigkeiten, aber auch *in vitro* Zellkulturüberständen und Zellysaten als Testreagentien in einem Immunoassay verwendet werden. Hierfür kommt jeder geeignete Immunoassay in Frage, insbesondere ein Enzym-gebundener Immunoabsorptionsassay (ELISA), ein Enzymimmunodotassay, ein Immunobead-Assay, ein passiver Hämagglutinations-Assay (PHA), ein Peptid-Antikörper-Peptid Sandwich Assay oder andere dem Fachmann bekannte Methoden.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Kit ein Gemisch der (Poly)peptide, die die in SEQ ID NR.: 1, 3, 4 und 8 gekennzeichneten Aminosäuresequenzen umfassen oder darstellen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung mindestens eines erfindungsgemäßen (Poly)peptids, und/oder eines

erfindungsgemäßen Polymers, und/oder eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins, und/oder eines (Poly)peptids, Polymers oder Fusionsproteins, hergestellt durch das erfindungsgemäße Verfahren, und/oder eines erfindungsgemäßen Konjugats zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von HHV8-assoziierten Erkrankungen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung sind die HHV8-assoziierten Erkrankungen Kaposi Sarkom, Castleman's Disease, Primary Effusion Lymphoma, interstitieller Pneumonie, Enzephalitis und multiple Myelome.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung mindestens eines erfindungsgemäßen (Poly)peptids, und/oder eines erfindungsgemäßen Polymers, und/oder eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins, und/oder eines (Poly)peptids, Polymers oder Fusionsproteins, hergestellt durch das erfindungsgemäße Verfahren, und/oder eines erfindungsgemäßen Konjugats zur Herstellung von Antikörpern.

Die Herstellung von Antikörpern ist dem Fachmann bekannt und umfaßt beispielsweise die Immunisierung eines Tieres mit einem Antigen, das gegebenenfalls an einen Carrier gekoppelt ist und/oder in Kombination mit anderen immunstimulierenden Substanzen verabreicht wird (siehe z.B. Harlow und Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988). Andere bekannte Methoden umfassen das Screening von Antikörperbibliotheken mittels "phage display"-Technologie und die rekombinante Herstellung des gewünschten Antikörpers.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung mindestens eines erfindungsgemäßen (Poly)peptids, und/oder eines erfindungsgemäßen Polymers, und/oder eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins, und/oder eines (Poly)peptids, Polymers oder Fusionsproteins, hergestellt durch das erfindungsgemäße Verfahren, und/oder eines erfindungsgemäßen Konjugats zum Nachweis von anti-HHV8 Antikörpern.

Die in der vorliegenden Beschreibung zitierten Literaturstellen sind hiermit per Interpretation Teil der Beschreibung.

Figur-Legenden:**Figur 1:**

Die Serumaktivität gegen den bevorzugten Peptidmix wurde bei HIV<sup>+</sup>/KS<sup>+</sup> Patienten ermittelt. Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie die Standardabweichung für (i) positive Seren, (ii) Seren von Patienten mit einer CD4-Zellzahl von weniger als 50/ $\mu$ l, (iii) negative Seren. Die durchschnittliche Serumaktivität ist bei Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien deutlich geringer als für das Gesamtkollektiv.

**Figur 2:**

Serumaktivität und CD4-Zellzahl im Verlauf. Serumproben eines HIV<sup>+</sup>/KS<sup>+</sup> Patienten wurden retrospektiv im HHV8 ELISA getestet. Bereits 14 Monate vor der Diagnose eines Kaposi Sarkoms sind HHV8-spezifische Antikörper im Blut des Patienten nachzuweisen. Die zusätzlich aufgetragenen CD4-Zellzahlen sind ein Maß für die relative Immundefizienz des Patienten.

**Figur 3:**

Schematische Darstellung der Entwicklung des HHV8 ELISA-Tests.

Wie in den folgenden Beispielen gezeigt wird, reagiert das erfindungsgemäße Verfahren (bei HIV Patienten) in der Regel schon mehrere Jahre vor der klinischen Diagnose eines Kaposi Sarkoms positiv. Da zur Zeit verschiedene Antiherpesmittel als mögliche KS Therapeutika in klinischer Erprobung sind, könnten diese oder andere antivirale Substanzen (sofern sie sich in der Behandlung von KS als wirksam erweisen) möglicherweise präventiv eingesetzt werden, sobald eine Infektion mit HHV8 sicher mit dem erfindungsgemäßen Verfahren/Kit nachgewiesen wird.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: ELISA Test

Für den KS Peptid ELISA werden N-terminal biotinylierte, 14 Aminosäuren lange Peptide (10 Aminosäuren des jeweiligen Antigens, Ser-Gly-Ser-Gly Tetrapeptid als Spacer) eingesetzt. Die Stammlösung der Peptide (1  $\mu$ mol/ml in 100% DMSO) wird zur

Beschichtung der Streptavidin-Mikrotiterplatten (Combiplate 8, Life Sciences oder MC, MicroCoat) 1:400 in PBS/5% Tween 20 verdünnt; hiervon werden jeweils 100 µl pro Well der MTP eingesetzt (250 pmol, d.h. in 10fachem Überschuß gegenüber der verfügbaren Menge an gebundenem Streptavidin) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten werden darauf 2x mit PBS/0,2% Tween 20 gewaschen und dann 1 Stunde bei Raumtemperatur mit PBS/5% Tween 20 geblockt. Vor der Inkubation mit dem Testmaterial (z.B. 1:100 verdünntes Patientenserum) für 1 Stunde bei Raumtemperatur werden die Platten 3x mit PBS/0,2% Tween 20 gewaschen.

Nach der Inkubation mit dem Testmaterial werden die Platten 5x gewaschen und danach mit einer 1:10.000 Verdünnung eines Peroxidase-konjugierten anti-Human IgG oder IgM Antikörpers für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgen 5 Waschgänge, die beiden letzten mit PBS ohne Tween.

Zum Nachweis gebundenen Konjugats werden 200 µl einer 1mg/ml ABTS Lösung in Peroxidase Arbeitspuffer (Boehringer Mannheim) pro Vertiefung der Mikrotiterplatte hinzugegeben und die Platten 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgt bei 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 492 nm. Die Probe wird als positiv gewertet, wenn der Meßwert >200 mO.D. über dem Mittelwert der Kontrolle (ohne Peptidgemisch) liegt (200 mO.D. entsprechen mind. 4 Standardabweichungen des Mittelwerts).

#### Beispiel 2: KS Serumpanel

Zur serologischen Bestätigung der Wirksamkeit wurde zunächst ein Panel von 380 Einzelseren von 185 Patienten mit einem Kaposi Sarkom untersucht. Von den 256 Seren, die nach der KS Diagnose entnommen wurden, reagierten 246 positiv mit dem bevorzugten Gemisch 1 (Peptide Nr. 1, 3, 4 und 8). Dies entspricht einer Sensitivität von 96,1%. Da in diesem Panel etliche Seren von HIV Patienten vertreten sind, bei denen das Immunsystem durch die fortschreitende HIV Infektion bereits stark geschädigt war (dies schränkt auch die Aktivierung der Antikörper produzierenden Zellen ein) ist die Sensitivität des Tests mit anderen Panels vermutlich noch höher.

79 von 96 Seren von Patienten mit stark eingeschränkter Funktion des Immunsystems (CD4-Werte < 50) reagierten positiv mit dem beschriebenen Peptidgemisch; der Mittelwert der Absorption bei 405 nm betrug 0,342, die Standardabweichung 0,264. Für die negativen Seren wurde ein Mittelwert von 0,046 und eine Standardabweichung von

0,038 ermittelt. 120 Seren zeigten eine starke Immunreaktivität ( $O.D.405nm > 0,6$ ). Für diese Seren liegt der Mittelwert der Absorption bei 405 nm von  $1,15 \pm 0,49$  O.D.(Figur 1).

#### Beispiel 3: Assay-Standardisierung

Zur Standardisierung des Assays wurden verschiedene Platten, Blockierungsmethoden und-Verdünnungsmittel getestet. Eine gleichbleibende Qualität der Plattenbeschichtung und optimierte Reaktionsbedingungen bestimmen sowohl die Sensitivität als auch die Reproduzierbarkeit des Assays maßgeblich mit. Der beschriebene KS ELISA weist mit dem bevorzugten Peptidgemisch sehr geringe Intra- und Interassay Varianzen auf. Der mittlere Varianzkoeffizient der 79 Doppelbestimmungen niedrigreaktiver Seren ist 4,39%. Bei den Patienten, von denen Verlaufsseren vorlagen, wurden keine Abweichungen in den Testergebnissen sukzessiver Serumproben festgestellt, nachdem eine Probe im Test einmal positiv war. Die Blankwerte (Inkubation nur mit Serum ohne Peptide) sind gut reproduzierbar (Mittelwert aus 30 Platten:  $128 \pm 45$  milli O.D.)

#### Beispiel 4: Kontrollpanels

Verschiedene Kontrollpanels sowie Kontrollpeptide wurden eingesetzt, um die Spezifität des HHV8 Antikörper ELISAs zu testen. Mit einem EBV Kontrollpeptid (siehe Tabelle 2) wurde untersucht, in wie vielen Fällen vergleichbare Antikörpertiter gegen HHV8 bzw. EBV (ein damit verwandtes Herpesvirus) nachgewiesen werden konnten. In 56 von 64 Fällen waren die beobachteten Antikörpertiter um mindestens 30% divergent; die EBV Durchseuchungsrate lag bei den HIV<sup>+</sup> Patienten bei 86%, bei den Kontrollseren bei 72%. 28 von 99 Seren zeigten sowohl gegen HHV8 als auch EBV eine hohe Immunreaktivität ( $O.D.405nm > 0,6$ ), 39 von 99 Seren hatten hohe anti-HHV8 und niedrige anti-EBV Titer, 7 von 99 niedrige anti-HHV8 und hohe anti-EBV Titer, bei 25 der 99 Seren waren sowohl die anti-HHV8 als auch die anti-EBV Immunreaktivität kleiner als 0,6. Aus diesen Daten läßt sich folgern, daß keine signifikante Kreuzreaktion des Assays mit EBV-Antigenen vorliegt.

Beispiel 5: Sensitivität

Ein hochreaktives Einzelserum wurde in Verdünnungen von 1:50 bis 1:12800 getestet. In dem kolorimetrischen Assay liefert selbst die höchste Serumverdünnung eine  $O.D.405nm > 1$ . Die mögliche Bandbreite des Assays ist hier durch das relativ schmale nutzbare Fenster des kolorimetrischen Detektionssystems limitiert. Durch den Einsatz verbesserter Nachweisverfahren (z.B. Chemilumineszenz) dürften lineare Bestimmungen der Antikörpertiter über einen Bereich von mehr als 3 Zehnerlogarithmen möglich sein. So könnten sowohl hochtitrige Seren quantifiziert werden als auch geringe Antikörpertiter sicher erkannt werden.

Beispiel 6: Prognostischer Wert

Von 20 KS Patienten, welche über einen längeren Zeitraum in Behandlung waren, wurden sukzessive Serumproben auf Immunreaktivität HHV8-spezifischer Antikörper untersucht. Der Zeitpunkt der jeweils ersten positiven Serumprobe lag im Schnitt  $20,4 \pm 14,6$  Monate vor der Erstdiagnose eines Kaposi Sarkoms. Da in den meisten Fällen die erste verfügbare Serumprobe bereits positiv getestet wurde, ist die tatsächliche "Inkubationszeit" wahrscheinlich länger. Der ELISA könnte somit Hinweise auf ein bestehendes Risiko für die Entwicklung eines Kaposi Sarkoms liefern. Die Verlaufskurve eines dieser Langzeitpatienten ist in Figur 2 dargestellt.

Beispiel 7: Ausschluß falschpositiver Test-Ergebnisse

Von insgesamt 589 getesteten KS und Kontrollseren reagierten 8 (1.36%) mit den leeren, nur mit Streptavidin allein beschichteten Kavitäten der Testmikrotiterplatten. Alle dieser Seren waren nach Vorinkubation auf Platten ohne Peptid negativ im HHV8 ELISA. Diese falsch-positiven Werte können durch die Verwendung probenspezifischer Blankwerte daher sicher ausgeschlossen werden. Solche serenspezifischen Blankwerte werden in keinem der bisher beschriebenen Testsysteme erfaßt, weswegen die aus unspezifisch reaktiven Seren resultierenden falschpositiven Ergebnisse nicht erfaßt werden können. Diese zusätzliche Kontrolle verhindert den unnötigen Ausschluß von Blutpräparaten und ist daher speziell für die Anwender in Blutbanken auch vom wirtschaftlichen Gesichtspunkt her interessant. Wie erste Tests ergeben haben, scheint

in Serumpanels aus südeuropäischen bzw. afrikanischen Ländern der Anteil unspezifisch reaktiver Seren zudem weit höher zu sein.

Beispiel 8: Vergleich des Antikörpertests mit DNA Nachweisverfahren

Von 100 Probanden wurden sowohl Serumproben als auch Präparationen genomischer DNA aus unfraktionierten peripheren Blutzellen hergestellt. Die Seren wurden in dem HHV8 Peptid-ELISA analysiert, die HHV8 DNAs mit einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit einer Nachweisgrenze von 5-10 Kopien/Reaktion (=1000-2000 Kopien/ml Blut) bestimmt. 5% der Probanden testeten positiv, obwohl der kontrollierte PCR-Nachweis negativ war.

1. Beral, V., Peterman, T.A., Berkelman, R.L. & Jaffe, H.W. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet* **335**, 123-128 (1990).
2. Kaposi, M. Idiopathisches multiples Pigmentsarkom der Haut. *Arch. Dermatol. Syphil.* **4**, 742-749 (1872).
3. Archibald, C.P. *et al.* Evidence for a sexually transmitted cofactor for AIDS-related Kaposi's sarcoma in a cohort of homosexual men. *Epidemiology* **3**, 203-209 (1992).
4. Chang, Y. *et al.* Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**, 1865-1869 (1994).
5. Russo, J.J. *et al.* Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma associated herpesvirus (HHV8). *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **93**, 14862-14867 (1996).
6. Dupin, N. *et al.* Herpesvirus-like DNA sequences in patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma. *Lancet* **345**, 761-762 (1995).
7. Huang, Y.Q. *et al.* Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet* **345**, 759-761 (1995).
8. Luppi, M. *et al.* Frequency and distribution of herpesvirus-like DNA sequences (KSHV) in different stages of classic Kaposi's sarcoma and in normal tissues from an Italian population. *Int J Cancer* **66**, 427-431 (1996).
9. Moore, P.S. & Chang, Y. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. *N Engl J Med* **332**, 1181-1185 (1995).
10. Moore, P.S. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma. *Aids* **10**, 175-180 (1996).
11. O'Neill, E. *et al.* Herpes virus-like sequences are specifically found in Kaposi sarcoma lesions. *J Clin Pathol* **49**, 306-308 (1996).
12. Whitby, D. *et al.* Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* **346**, 799-802 (1995).
13. Soulier, J. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castelman's disease. *Blood* **86**, 1276-1280 (1995).

14. Lin, J.C. *et al.* Is Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus detectable in semen of HIV-infected homosexual men? *Lancet* **346**, 1601-1602 (1995).
15. Said, J.W., Tasaka, T., Devos, S. & Koeffler, H.P. Kaposi sarcoma associated herpesvirus human herpesvirus type 8 encephalitis in HIV positive and negative individuals. *Aids* **11**, 1119-1122 (1997).
16. Rettig, M.B. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science* **276**, 1851-1854 (1997).
17. Lunardi-Iskandar, Y. *et al.* Tumorigenesis and metastasis of neoplastic Kaposi's sarcoma cell line in immunodeficient mice blocked by a human pregnancy hormone. *Nature* **375**, 64-68 (1995).
18. Mori, S., Murakami, M.K., Jewett, A., Nakamura, S. & Bonavida, B. Resistance of AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res* **56**, 1874-1879 (1996).
19. Cheng, E.H.Y. *et al.* A bcl 2 homolog encoded by Kaposi Sarcoma associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with bax or bak. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **94**, 690-694 (1997).
20. Molden, J., Chang, Y., You, Y., Moore, P.S. & Goldsmith, M.A. A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit. *J Biol Chem* **272**, 19625-19631 (1997).
21. Cesarman, E. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. *J Virol* **70**, 8218-8223 (1996).
22. Li, M. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J Virol* **71**, 1984-1991 (1997).
23. Tasaka, T. *et al.* Is Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ubiquitous in urogenital and prostate tissues? *Blood* **89**, 1686-1689 (1997).
24. Gao, S.J. *et al.* KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med* **2**, 925-928 (1996).
25. Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P.S., Said, J.W. & Knowles, D.M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* **332**, 1186-1191 (1995).

26. Lock, M.J., Griffiths, P.D. & Emery, V.C. Development of a quantitative competitive polymerase chain reaction for human herpesvirus 8. *J Virol Methods* **64**, 19-26 (1997).
27. Cathomas, G. *et al.* Detection of herpesvirus-like DNA by nested PCR on archival skin biopsy specimens of various forms of Kaposi sarcoma. *J Clin Pathol* **49**, 631-633 (1996).
28. Boshoff, C. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nat Med* **1**, 1274-1278 (1995).
29. Rainbow, L. *et al.* The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by ORF73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J Virol* **71**, 5915-5921 (1997).
30. Kedes, D.H., Ganem, D., Ameli, N., Bacchetti, P. & Greenblatt, R. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi sarcoma-associated herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *Jama* **277**, 478-481 (1997).
31. Davis, D.A. *et al.* Detection of serum antibodies to a Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-specific peptide. *J Infect Dis* **175**, 1071-1079 (1997).
32. Simpson, G.R. *et al.* Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **348**, 1133-1138 (1996).
33. André, S. *et al.* Detection of antibodies against viral capsid proteins of human herpesvirus 8 in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J. Mol. Med.* **75**, 145-152 (1997).
34. Miller, G. *et al.* Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *N Engl J Med* **334**, 1292-1297 (1996).

25  
TABELLE 1

Mit KS Seren reaktive Peptide. Die Positionsangaben beziehen sich auf die publizierte Sequenz des HHV8 Genoms von Russo et al. (5) (Genbank accession No. U75698).

| Nr. | Seq ID | Position      | Sequenz      | ORF               |
|-----|--------|---------------|--------------|-------------------|
| 1   | KS20A  | 35573-35544   | MYEVFTDFPV   | tegument          |
| 2   | KS29bG | 50000-49971   | DPAYTNNTA    | packaging protein |
| 3   | KS29bP | 49394-49365   | RHMYKPISPQ   | packaging protein |
| 4   | KS65A  | 112443-112414 | MSNFKVRDPV   | capsid            |
| 5   | KS65X  | 111960-111931 | ARKPPSGKKK   | capsid            |
| 6   | KS73J  | 124726-124697 | QEEQELEEVE   | LANA              |
| 7   | KSK12D | 118023-117994 | AIPPLVCLLA   | kaposin           |
| 8   | KS8.1A | 75999-76034   | PTYRSHLGFWQE | glycoprotein      |

TABELLE 2

Sequenzen der verwendeten Kontroll-Peptide. Die Positionsangaben beziehen sich auf HIV-1 HXB2 (Genbank accession no. M38432), Epstein-Barr Virus Stamm B95-8 (V01555) sowie Poliovirus Typ Sabin 1 (V01150). Die jeweils ersten 4 Aminosäuren in kursiven Lettern (SGSG) wurden als Spacer eingefügt.

| Nr. | Seq ID  | Position      | Sequenz                  | ORF         |
|-----|---------|---------------|--------------------------|-------------|
| 1   | HIV B   | 8007-8036     | <i>SGSG</i> GIWGC SGKLIC | TM (gp41)   |
| 2   | EBV A   | 100695-100724 | <i>SGSG</i> QEP PAPI     | EBNA 6      |
| 3   | polio B | 2603-2632     | <i>SGSG</i> PALTAVETGA   | VP 1 capsid |

26  
SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

(A) NAME: Dr. Octavian SCHATZ  
(B) STRASSE: Steinbergstr. 30  
(C) ORT: Altomünster  
(D) BUNDESLAND: Bayern  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 85250

(A) NAME: Dr. Juergen HAAS  
(B) STRASSE: Brunellenweg 39  
(C) ORT: München  
(D) BUNDESLAND: Bayern  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 80689

(ii) ANMELDEITITEL: Neue (Poly)peptide, die Epitope des humanen Herpesvirus 8 darstellen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Tyr | Glu | Val | Phe | Thr | Asp | Phe | Pro | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

27

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Pro | Ala | Tyr | Thr | Asn | Asn | Thr | Glu | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | His | Met | Tyr | Lys | Pro | Ile | Ser | Pro | Gln |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ser | Asn | Phe | Lys | Val | Arg | Asp | Pro | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Arg | Lys | Pro | Pro | Ser | Gly | Lys | Lys | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

28

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Glu | Glu | Gln | Glu | Leu | Glu | Glu | Val | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ile | Pro | Pro | Leu | Val | Cys | Leu | Leu | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Thr | Tyr | Arg | Ser | His | Leu | Gly | Phe | Trp | Gln | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ser | Gly | Ile | Trp | Gly | Cys | Ser | Gly | Lys | Leu | Ile | Cys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

29

- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ser | Gly | Gln | Glu | Pro | Pro | Ala | Pro | Gln | Ala | Pro | Ile |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzel
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ser | Gly | Pro | Ala | Leu | Thr | Ala | Val | Glu | Thr | Gly | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |

Patentansprüche

1. (Poly)peptid, das von anti-HHV8 Antikörpern HHV8-infizierter Patienten erkannt wird und dadurch gekennzeichnet ist, daß es
  - (a) eine der in SEQ ID NR.:1 bis 8 gekennzeichneten Aminosäuresequenzen umfaßt;
  - (b) aus einer der in SEQ ID NR.:1 bis 8 gekennzeichneten Aminosäuresequenzen besteht; oder
  - (c) aus einer Aminosäuresequenz besteht, die von einer der in (a) oder (b) gekennzeichneten Aminosäuresequenzen durch eine oder mehrere Substitutionen, Deletionen und/oder Insertionen abweicht;wobei das (Poly)peptid kein natürlich vorkommendes HHV8-Protein ist.
2. (Poly)peptid nach Anspruch 1(c), das eine natürlich vorkommende Sequenzvariante ist.
3. Polymer, das mindestens zwei gleiche oder verschiedene (Poly)peptide nach Anspruch 1 oder 2 umfaßt.
4. Polymer nach Anspruch 3, das durch eine unverzweigte Kette von polymerisierten (Poly)peptiden nach Anspruch 1 oder 2 gekennzeichnet ist.
5. Polymer nach Anspruch 3, das durch verzweigte Ketten von polymerisierten (Poly)peptiden nach Anspruch 1 oder 2 gekennzeichnet ist.
6. (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2, oder Polymer nach einem der Ansprüche 3 bis 5, das chemisch synthetisiert ist.
7. Fusionsprotein, das ein (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2, oder ein Polymer nach Anspruch 3 oder 4 umfaßt.
8. Polynukleotid, das ein (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2, ein Polymer nach Anspruch 3 oder 4, oder ein Fusionsprotein nach Anspruch 7 codiert.

9. Polynukleotid nach Anspruch 8, das DNA oder RNA ist.
10. Vektor, der ein Polynukleotid nach Anspruch 8 oder 9 umfaßt.
11. Vektor nach Anspruch 10, der ein Expressionsvektor ist.
12. Wirtszelle, die einen Vektor nach Anspruch 11 enthält.
13. Verfahren zur Herstellung eines (Poly)peptids nach Anspruch 1 oder 2, eines Polymers nach Anspruch 3 oder 4 oder eines Fusionsproteins nach Anspruch 7, das folgende Schritte umfaßt:
  - (a) Züchtung der Wirtszelle nach Anspruch 12 unter Bedingungen, die die Expression des (Poly)peptids, des Polymers oder des Fusionsproteins bewirken; oder
  - (b) in vitro Transkription und/oder Translation des Polynukleotids nach Anspruch 8;und Gewinnung des in (a) oder (b) hergestellten (Poly)peptids, Polymers oder Fusionsproteins.
14. Konjugat, das ein (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2, ein Polymer nach einem der Ansprüche 3 bis 5, ein (Poly)peptid oder Polymer nach Anspruch 6, ein Fusionsprotein nach Anspruch 7 oder ein (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein, hergestellt durch das Verfahren nach Anspruch 13, umfaßt.
15. Zusammensetzung, die mindestens ein (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2, und/oder ein Polymer nach einem der Ansprüche 3 bis 5, und/oder ein (Poly)peptid oder Polymer nach Anspruch 6, und/oder ein Fusionsprotein nach Anspruch 7, und/oder ein (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein, hergestellt durch das Verfahren nach Anspruch 13, und/oder ein Konjugat nach Anspruch 14 umfaßt und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel.
16. Zusammensetzung nach Anspruch 15, die ein Arzneimittel ist.

17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, die ein Impfstoff ist.

18. Verfahren zum Nachweis von anti-HHV8 Antikörpern, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Inkontaktbringen einer biologischen Probe mit mindestens einem (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2, und/oder einem Polymer nach einem der Ansprüche 3 bis 5, und/oder einem (Poly)peptid oder Polymer nach Anspruch 6, und/oder einem Fusionsprotein nach Anspruch 7, und/oder einem (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein, hergestellt durch das Verfahren nach Anspruch 13, und/oder einem Konjugat nach Anspruch 14, unter Bedingungen, die die Bindung von Antikörpern erlauben; und
- (b) Nachweis der in Schritt (a) gebunden Antikörper.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei ein Gemisch der (Poly)peptide, die die in SEQ ID NR.:1, 3, 4 und 8 gekennzeichneten Aminosäuresequenzen umfassen, verwendet wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die (Poly)peptide chemisch synthetisiert sind.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei das Gemisch die (Poly)peptide in einem molaren Verhältnis von 1:1:1:1 umfaßt.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21, das ein Enzym-gebundener Immunoabsorptionsassay (ELISA), ein Enzymimmunodotassay, ein Immunobead-Assay, ein passiver Hämagglutinations-Assay (PHA) oder ein Peptid-Antikörper-Peptid Sandwich-Assay ist.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei die biologische Probe Blut, Serum, Gewebeextrakt, Gewebeflüssigkeit, Zellkulturüberstand, oder Zellysat ist.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 23, das den weiteren Schritt umfaßt:

- (c) Nachweis von unspezifischen Bindungen, die von in der biologischen Probe zusätzlich vorhandenen Antikörpern in Schritt (a) verursacht werden.

25. Kit, enthaltend:

- (a) mindestens ein (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2, und/oder ein Polymer nach einem der Ansprüche 3 bis 5, und/oder ein (Poly)peptid oder Polymer nach Anspruch 6, und/oder ein Fusionsprotein nach Anspruch 7, und/oder ein (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein, hergestellt durch das Verfahren nach Anspruch 13, und/oder ein Konjugat nach Anspruch 14, wobei die Komponenten getrennt voneinander oder in Form eines Gemisches enthalten sind; und gegebenenfalls
- (b) eine feste Phase, an die mindestens ein (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2, und/oder ein Polymer nach einem der Ansprüche 3 bis 5, und/oder ein (Poly)peptid oder Polymer nach Anspruch 6, und/oder ein Fusionsprotein nach Anspruch 7, und/oder ein (Poly)peptid, Polymer oder Fusionsprotein, hergestellt durch das Verfahren nach Anspruch 13, und/oder ein Konjugat nach Anspruch 14 gebunden werden kann;
- (c) ein Probenverdünnungsmittel; und/oder
- (d) eine Negativkontrolle; und/oder
- (e) eine Positivkontrolle; und/oder
- (f) ein Reportermolekül.

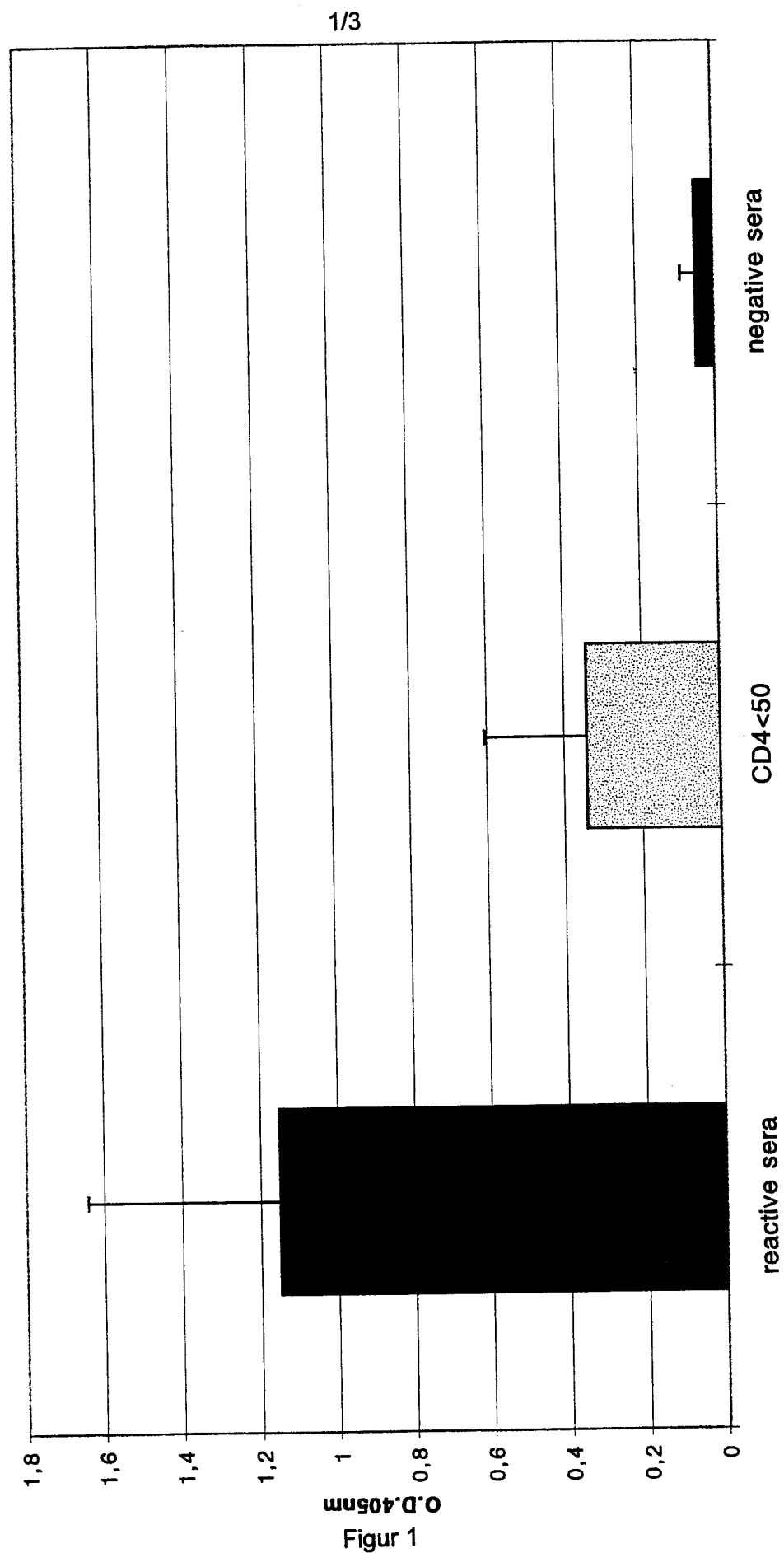
26. Kit nach Anspruch 25, der ein Gemisch der (Poly)peptide, die die in SEQ ID NR.: 1, 3, 4 und 8 gekennzeichneten Aminosäuresequenzen umfassen oder darstellen, enthält.

27. Verwendung mindestens eines (Poly)peptids nach Anspruch 1 oder 2, und/oder eines Polymers nach einem der Ansprüche 3 bis 5, und/oder eines (Poly)peptids oder Polymers nach Anspruch 6, und/oder eines Fusionsproteins nach Anspruch 7, und/oder eines (Poly)peptids, Polymers oder Fusionsproteins, hergestellt durch das Verfahren nach Anspruch 13, und/oder eines Konjugats nach Anspruch 14 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von HHV8-assoziierten Erkrankungen.

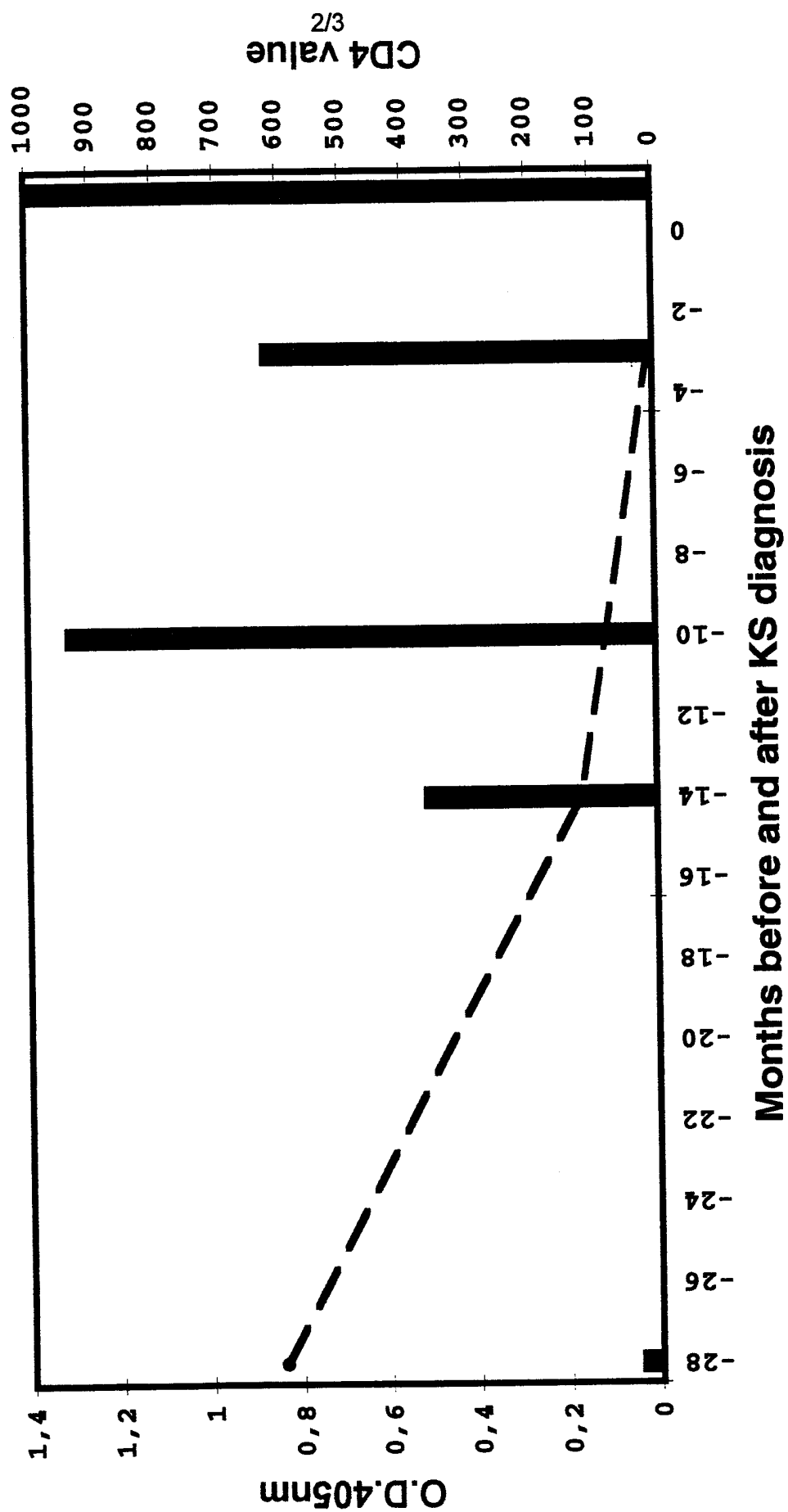
28. Verwendung nach Anspruch 27, wobei die HHV8-assoziierten Erkrankungen Kaposi Sarkom, Castleman's Disease, Primary Effusion Lymphoma, interstitieller Pneumonie, Enzephalitis und multiple Myelome sind.

29. Verwendung mindestens eines (Poly)peptids nach Anspruch 1 oder 2, und/oder eines Polymers nach einem der Ansprüche 3 bis 5, und/oder eines (Poly)peptids oder Polymers nach Anspruch 6, und/oder eines Fusionsproteins nach Anspruch 7, und/oder eines (Poly)peptids, Polymers oder Fusionsproteins, hergestellt durch das Verfahren nach Anspruch 13, und/oder eines Konjugats nach Anspruch 14 zur Herstellung von Antikörpern.
30. Verwendung mindestens eines (Poly)peptids nach Anspruch 1 oder 2, und/oder eines Polymers nach einem der Ansprüche 3 bis 5, und/oder eines (Poly)peptids oder Polymers nach Anspruch 6, und/oder eines Fusionsproteins nach Anspruch 7, und/oder eines (Poly)peptids, Polymers oder Fusionsproteins, hergestellt durch das Verfahren nach Anspruch 13, und/oder eines Konjugats nach Anspruch 14 zum Nachweis von anti-HHV8 Antikörpern.

# Serumreaktivität in HIV Patienten und Kontrollen



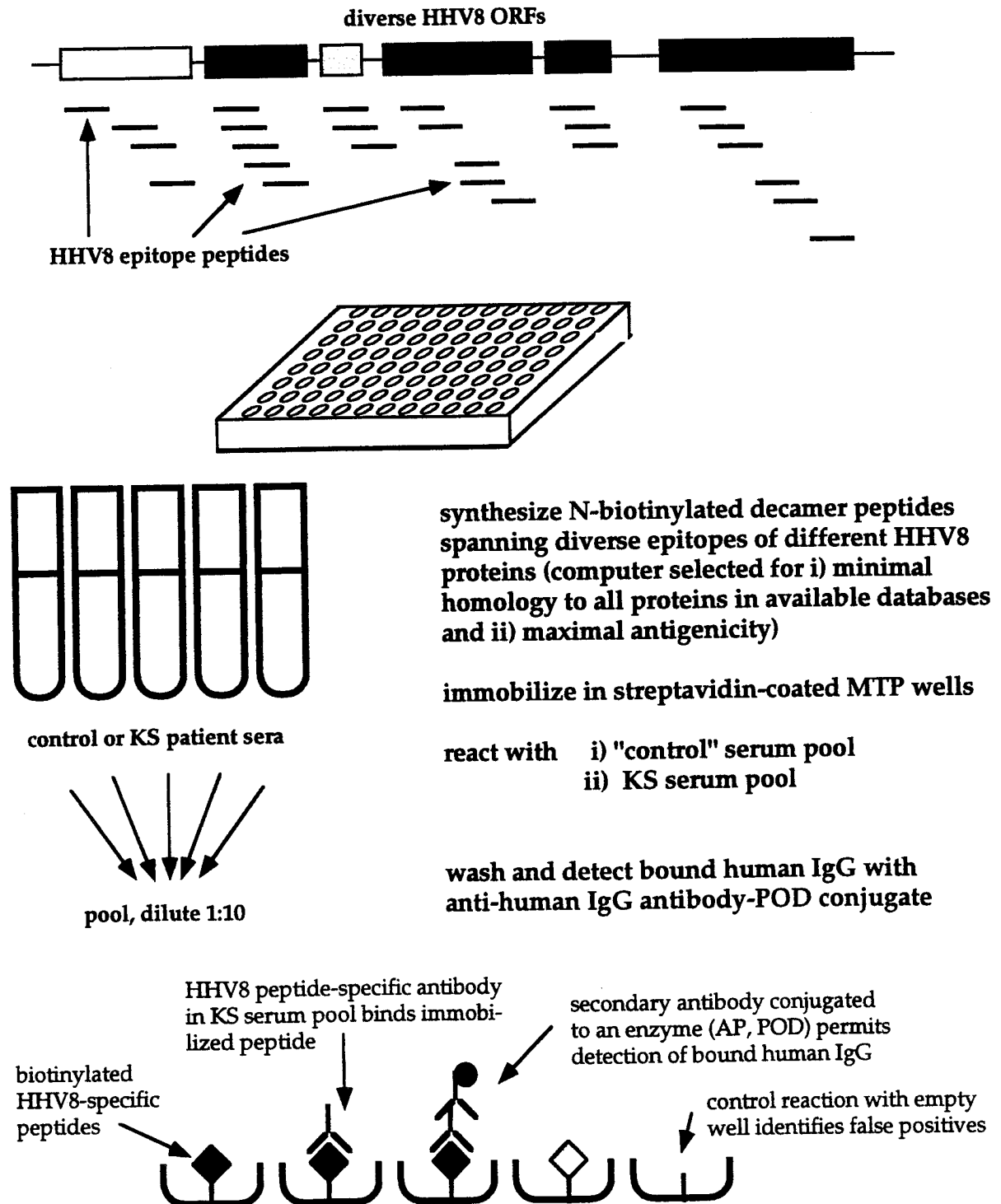
A. S.



Figur 2

3/3

## Outline of peptide based KS antibody ELISA



**Retest positive peptides with individual sera (both from KS patients and controls)**

**Figur 3**