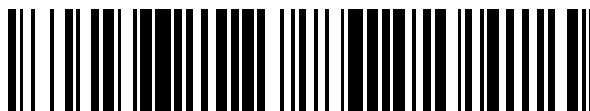


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 095**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09719883 .2**
96 Fecha de presentación: **10.03.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2269069**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2011**

54 Título: **UTILIZACIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DERIVADO DE LA PROTEÍNA ZEBRA PARA EL DIAGNÓSTICO IN VIVO DE LA REACTIVACIÓN DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR (EBV).**

30 Prioridad:
10.03.2008 EP 08290224

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.02.2012

73 Titular/es:
**Université Joseph Fourier
621 Avenue Centrale Domaine Universitaire B.P.
53
38041 Grenoble Cedex 09, FR**

72 Inventor/es:
DROUET, Emmanuel

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireia**

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).

ES 2 375 095 T3

DESCRIPCIÓN

Utilización del péptido sintético derivado de la proteína Zebra para el diagnóstico *in vivo* de la reactivación del virus de Epstein-Barr (EBV).

La presente invención se refiere a la utilización de un péptido sintético derivado de la proteína ZEBRA, para el diagnóstico *in vitro* de la reactivación del virus de Epstein-Barr (EBV). La presente invención se refiere particularmente a un procedimiento para la determinación del nivel de los anticuerpos IgG para diagnosticar la reactivación del EBV.

El virus de Epstein-Barr (EBV) es un virus herpes-gamma que establece una infección latente en los linfocitos B humanos, que transforma de forma eficiente las células en progenies celulares linfoblastoides (LCL), y que está implicado en la etiología de la mononucleosis infecciosa, linfoma de Burkitt (BL), enfermedad de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo (NPC) y las enfermedades linfoproliferativas en individuos inmunocomprometidos (Epstein MA & Crawford DH, 2005; Klein G, 2005; Cohen JL, 2005).

Mientras que la infección primaria es acompañada a menudo por un período autolimitado de enfermedad clínica, la latencia prolongada no presenta síntomas. Después de la activación, la transcripción de los genes virales cambia desde la fase latente a la fase lítica, que conduce a la potenciación de la replicación y a la producción vírica. El virus puede adoptar cuatro programas de latencia (latencia 0, I, II y III).

En los individuos sanos, la infección EBV latente parece estar limitada a las células B de memoria en reposo, (Babcock *et al*, 1998). Los únicos productos génicos del EBV que se detectan de forma consistente en estas células son (i) las proteínas de membrana LMP1 y LMP2A/2B latentes (ii), los EBNA (Antígenos Nucleares del Epstein-Barr), que definen un patrón de expresión génica en la latencia denominada actual (Thorley-Lawson *et al*, 1996).

En las biopsias del linfoma de Burkitt, sólo se expresa (latencia 1) el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBNA1). En la enfermedad de Hodgkin, NPC y en los linfomas de las células T, se expresan (latencia II) EBNA 1 y combinaciones variables de los tres miembros de la familia de las proteínas de membrana latentes (LMP1, LMP2 y LMP2B). Durante la mononucleosis infecciosa aguda, en los síndromes linfoproliferativos en los individuos inmunocomprometidos, y en LCL establecidos *in vitro*, se expresan (latencia III) la totalidad de los seis antígenos nucleares (EBNA 1-6). Además, se expresan los tres LMP. Las progenies celulares infectadas por EBV son, bien completamente no productivas de partículas virales, o contienen además una pequeña subpoblación de células que han cambiado espontáneamente de un estado infeccioso latente a un ciclo lítico.

El mecanismo del cambio no se conoce completamente, pero uno de las primeras alteraciones detectables en la expresión génica viral es la activación del gen inmediato-prematuro BZLF1 de EBV, que codifica el transactivador ZEBRA de cambio lítico (Flemington *et al*, 1991). ZEBRA, junto con el producto proteico del gen BRLF1, inicia entonces la cascada del ciclo lítico (Feederle *et al*, 2000).

Los adultos EBV-positivos, inmunológicamente sanos o inmunodeprimidos, presentan un nivel de replicación lítica idéntico del virus EBV (Hong *et al*, 2005; Montone *et al*, 1996). Esta replicación activa del virus es probablemente necesaria para la persistencia a lo largo de la vida.

Mientras que los individuos inmunocompetentes pueden limitar la proliferación de las células infectadas por el virus EBV y muestran a menudo perfiles séricos estandarizados, los que muestran inmunodeficiencia congénita o adquirida son muy susceptibles a las linfoproliferaciones asociadas al EBV.

La proteína ZEBRA (SEC ID nº 6) es un factor de transcripción y contiene tres dominios funcionales que están formados por la parte amino terminal de un dominio transactivador, un dominio de unión al ADN y la parte carboxi-terminal de la proteína, un dominio de dimerización.

ZEBRA es una proteína muy inmunogénica y contiene muchos epítomos que pueden ser reconocidos por los anticuerpos. Algunos estudios dan a conocer la utilización de la proteína ZEBRA para detectar la reactivación del EBV:

Drouet *et al* (Drouet *et al*, 1999), dan a conocer la utilización de la proteína ZEBRA para la detección de la enfermedad de Hodgkin. ZEBRA permite detectar en el suero de los pacientes anticuerpos dirigidos contra ZEBRA, de forma dependiente de la dosis.

Touge *et al* (Touge *et al*, 2006) y Tedeschi *et al* (2006), dan a conocer la utilización de ZEBRA para detectar la reactivación de EBV en pacientes con uveítis o leucemia, respectivamente.

Dardari *et al* (Dardari *et al*, 2001), dan a conocer la utilización de ZEBRA y de las proteínas p54 y p138 para potenciar la reactivación de EBV.

Aunque todos los documentos previos dan a conocer procedimientos que utilizan la proteína ZEBRA para detectar la reactivación de EBV, ninguno de estos documentos menciona que los fragmentos de ZEBRA pueden utilizarse para proporcionar un procedimiento que detecte la reactivación de EBV.

5 Entre los epítomos de ZEBRA, se han identificado dos polipéptidos principales que contienen las regiones inmunogénicas principales de ZEBRA, P130 ZEBRA y P125 ZEBRA. P130 ZEBRA corresponde a los aminoácidos 157 a 195 de la proteína ZEBRA, y P125 corresponde a los aminoácidos 59 a 93 de la proteína ZEBRA.

10 Entre los anticuerpos producidos durante el curso de la infección, los anticuerpos contra la proteína ZEBRA son detectados durante un proceso particular denominado reactivación de EBV (Maréchal *et al*, 1993, Joab *et al*, 1991, Brousset *et al*. AIDS, 1994).

15 La serología ha constituido una ayuda importante en el diagnóstico de las infecciones por EBV, mucho antes del descubrimiento del virus en sí mismo, en 1964. La infección con el EBV produce un amplio espectro de anticuerpos para los distintos antígenos, tanto estructurales como no estructurales (Henle W y Henle G, 1981).

20 Durante el curso de la infección, los niveles de anticuerpos para los distintos antígenos del EBV aumentarán y a continuación, disminuirán, proporcionando información válida con respecto al estadio de la infección. Las diferencias individuales en el sistema inmunitario de los pacientes significan que ningún individuo producirá exactamente el mismo perfil de anticuerpos en un momento dado. Sin embargo, la secuencia de la producción de anticuerpos durante el curso de la infección, es suficientemente constante para proporcionar útil información diagnóstica.

25 La aparición de anticuerpos anti-ZEBRA constituye un momento importante durante el diagnóstico serológico de las patologías asociadas con EBV y durante el seguimiento de los pacientes que presentan una disposición para desarrollar una patología asociada con los pacientes inmunodeprimidos por EBV y con los pacientes que sufran neoplasias asociadas con la infección por EBV.

30 Algunos trabajos han descrito P130 y P125, y la utilización de sus propiedades inmunogénicas como marcadores diagnósticos y pronósticos para la detección de la infección por EBV y durante la progresión de patologías asociadas con la infección por el EBV.

35 El documento WO96/21155 da a conocer un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de la proteína P130 ZEBRA durante una infección primaria por EBV. Este documento da a conocer sólo la utilización de P130 durante las primeras etapas de la enfermedad, pero no durante el segundo repunte de ésta, por ejemplo, la reactivación del EBV.

40 Dardari *et al* (Dardari *et al*, 2007) describen el significado pronóstico de las proteínas ZEBRA P125 y P130 durante el carcinoma nasofaríngeo (NPC). Este artículo demuestra que los anticuerpos dirigidos contra P125 se encuentran más en pacientes con NPC, cualquiera que sea su edad, que los anticuerpos dirigidos contra P130. Sin embargo, este artículo no describe el uso de otras proteínas EBV como marcadores pronósticos.

45 El documento WO00/55622 se refiere a una composición farmacéutica que incluye, en particular, la proteína ZEBRA P100, para prevenir la infección por el virus EBV, y para evitar el desarrollo de patologías tales como el linfoma de Burkitt, la enfermedad de Hodgkin y el carcinoma nasofaríngeo.

50 Marechal *et al* (Research Virology, 1993, vol 144, n° 5, p 397-404), dan a conocer un ensayo ELISA que incluye ZEBRA para el cribado de la reactivación de EBV en los pacientes HIV positivos.

55 Hasta la fecha, no existe un procedimiento que permita de modo eficiente y rápido la detección de la reactivación del virus EBV en pacientes sanos infectados con el virus EBV o en pacientes afectados de patologías asociadas con la infección por EBV.

60 La invención se basa en la inesperada observación de que los anticuerpos IgG contra la proteína ZEBRA P100 aparecen más rápidamente que los anticuerpos contra P130 o cualquier otra proteína del virus EBV, tal como las proteínas EBNA, VCA y EA. En particular, se descubrió sorprendentemente que el polipéptido ZEBRA P100 constituye un polipéptido inmunogénico muy eficiente, que puede utilizarse para detectar anticuerpos producidos durante la reactivación de EBV.

65 El objetivo de la invención consiste en proporcionar un procedimiento para detectar anticuerpos IgG contra la proteína EBV ZEBRA durante las patologías asociadas con la reactivación de EBV en el paciente.

La presente exposición se refiere a la utilización de por lo menos un polipéptido derivado de la proteína ZEBRA que incluye por lo menos la siguiente secuencia aminoácida representada por SEC ID n° 1, para el cribado *in vitro* y *ex vivo* de la reactivación del virus EBV en una muestra biológica de un individuo afectado por una patología asociada con la infección por EBV. El polipéptido utilizado representado por SEC ID n° 1, se define por la secuencia siguiente: -X1-P-X2-P-X3-P-X4, en la que:

- X1 puede representar un aminoácido con la excepción de la prolina, o una secuencia desde cualesquiera de dos aminoácidos consecutivos a cualesquiera de diecinueve aminoácidos consecutivos, en la que el último aminoácido no es una prolina.

5 - X2 y X3 pueden representar independientemente entre ellos un aminoácido seleccionado a partir de los aminoácidos conocidos, con excepción de la prolina.

10 - X4 puede representar un aminoácido, con excepción de la prolina, o una secuencia desde cualquiera de dos aminoácidos consecutivos a cualquiera de doce aminoácidos consecutivos, en la que el primer aminoácido no es una prolina.

La invención se refiere a la utilización del fragmento ZEBRA P100 formado por la secuencia SEC ID nº 5 o SEC ID nº 8, para el cribado *in vitro* y *ex vivo* de la reactivación del virus EBV en una muestra biológica de un individuo afectado por una patología asociada con la infección por EBV.

15 Según la exposición, los aminoácidos se seleccionan de entre el grupo constituido por los veinte aminoácidos naturales: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, triptófano, tirosina y valina. Según la invención, cada aminoácido puede también seleccionarse a partir de los aminoácidos no estándares: selenocisteína, pirrolisina, lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, dehidroalanina, ácido gamma aminobutírico, ornitina y citrulina. Los aminoácidos no estándares se forman habitualmente modificaciones en los aminoácidos estándar. Según la invención, los aminoácidos pueden corresponder también a la homocisteína S-adenosil metionina y a la hidroxiprolina.

25 La exposición se refiere asimismo a las utilizaciones de variantes o isoformas de por lo menos un polipéptido caracterizado porque comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº 1.

30 La invención no se refiere a la utilización de este polipéptido para el cribado *in vitro* y *ex vivo* de la reactivación del virus EBV en una muestra biológica de un individuo, cuando dicho polipéptido corresponde a las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 4, SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7, que corresponden a la SEC ID nº 6, en la que los 24 aminoácidos en el extremo N, se han eliminado.

Una forma de realización de la exposición se refiere a la utilización de un polipéptido derivado de la proteína ZEBRA que incluye por lo menos la siguiente secuencia aminoácida: X1-P-X2-P-X3-P-X4, en la que:

35 X1 es -A1-A2-A3, seleccionándose A1 entre F, Y, W, A2 entre S, T, Y y A3 entre G, A, V, L, I

X2 es seleccionado entre Q, N, E, D,

40 X3 es seleccionado entre G, A, V, L, I

X4 es B1-B2-B3-B4-, seleccionándose B1 entre E, D, N, Q, B2 entre N, Q, D, E, B3 entre G, A, V, L, I, y B4 entre F, Y, W, X1, X2, X3.

45 para el cribado *in vitro* y *ex vivo* de la reactivación del virus EBV en una muestra biológica de un individuo afectado por una patología asociada con la infección por EBV.

El polipéptido que corresponde al polipéptido P125 ZEBRA está representado por SEC ID nº 4. El polipéptido P125 está contenido en la proteína ZEBRA, y corresponde a los aminoácidos 59-93 de la proteína ZEBRA.

50 Cuando el polipéptido SEC ID nº 1 es un polipéptido P125 ZEBRA, X1, X2, X3 y X4 se definen como:

X1: GQLTAYHVSTAPTGSWFSA, representado SEC ID nº 2, y

X4: ENAYQAYAPQLF, representado por SEC ID nº 3,

X2: Q, y

55 X3: A.

En el contexto de la invención, el polipéptido -X1-P-X2-P-X3-P-X4- corresponde al polipéptido P100 ZEBRA, representado por SEC ID nº 5. El polipéptido P100 ZEBRA corresponde a los aminoácidos 75-86 de la proteína ZEBRA. Por tanto, la secuencia aminoácida del polipéptido utilizado es -F-S-A-P-Q-P-A-P-E-N-A-Y.

60 Según la exposición, un polipéptido derivado de la proteína ZEBRA que incluye por lo menos la siguiente secuencia aminoácida representada por SEC ID nº 1, puede modificarse asimismo para injertar una molécula o un compuesto que permite la detección, o el anclaje, de dicho polipéptido derivado de la proteína ZEBRA.

65 Por ejemplo, dicha molécula o compuesto puede ser biotina, estreptavidina, marcadores proteicos, moléculas fluorescentes, utilizándose habitualmente dicha molécula o compuesto por un experto en la materia.

De este modo, otro polipéptido específico que puede utilizarse según la invención, está representado por la secuencia aminoácida SEC ID nº 8 (-F-S-A-P-Q-P-A-P-E-N-A-Y-G-S-K), que corresponde al polipéptido P100 (SEC ID nº 5), en el que el péptido G-S-K se añade al extremo terminal C de la secuencia P-100.

- 5 Según la exposición, los términos "polipéptidos" y "péptidos" significan fragmentos de una proteína, constituidos, por lo menos, por dos aminoácidos. Por extensión, "polipéptido de la proteína ZEBRA", significa un fragmento de la proteína ZEBRA, constituido, al menos, por SEC ID nº 1.

- 10 Según la exposición, "variante" se define como un polipéptido que difiere del polipéptido de referencia, pero conserva las propiedades esenciales. Las variantes y los polipéptidos de referencia comparten secuencias aminoácidas similares, con, por ejemplo, el 90% de identidad aminoácida, preferentemente, el 95% de identidad aminoácida, y más preferentemente, el 99% de identidad aminoácida. Por "isoforma", se hace referencia según la descripción, a un polipéptido que difiere del polipéptido de referencia con propiedades esenciales conservadas, siendo codificadas dichas isoformas por productos génicos que provienen del corte y empalme alternativo de un mismo gen o por productos que provienen de la expresión de varios genes homólogos de cuyas secuencias han divergido.

- 20 La utilización de la exposición permite determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgG dirigidos contra el polipéptido ZEBRA descrito anteriormente, en una muestra biológica de un individuo.

- 25 En una forma de realización, la exposición se refiere también a la utilización de por lo menos un polipéptido derivado de la proteína ZEBRA, para el cribado *in vitro* y *ex vivo* de la reactivación del virus EBV en una muestra biológica de un individuo que está afectado por una patología asociada con la infección por EBV, en la que las patologías asociadas con la infección por EBV se seleccionan de entre el grupo constituido por tumores específicos del huésped inmunocomprometido, tumores del huésped inmunocompetente y el síndrome viral relacionado con EBV.

La muestra biológica de la invención es un fluido corporal, preferentemente sangre o plasma. El fluido corporal podría ser eventualmente saliva, orina o linfa. Cualquier otro fluido corporal podría ser considerado en la invención.

- 30 Según la invención, las patologías asociadas con la infección por EBV se definen como patologías durante las cuales el virus EBV se encuentra en las células huéspedes virales.

- 35 Tres etapas distintas representan la infección por el virus EBV: primoinfección, etapa de latencia y reactivación. Según la invención, las patologías asociadas con la infección por EBV describen preferentemente la reactivación viral, pero no excluyen la etapa de latencia. Sin embargo, la invención no comprende las patologías que corresponden a la primoinfección por el virus EBV.

- 40 El individuo que está afectado por la patología asociada con la infección por EBV desarrolla los síntomas característicos de la enfermedad, bien conocidos por los expertos en la materia. Los síntomas característicos de la enfermedad están determinados por el conocimiento fisiopatológico y clínico de la enfermedad (Henle W y Henle G, 1981).

- 45 En la invención, los términos "patología", "enfermedad", dolencia y "forma maligna", se utilizan de modo uniforme para definir un estado anormal de un organismo en el que sus funciones están alteradas.

Las patologías que se describen en la presente invención están relacionadas con la infección por EBV. Más particularmente, se refieren a patologías asociadas con alteraciones del sistema inmunitario, que conducen a la susceptibilidad con respecto a las infecciones oportunistas.

- 50 - Los tumores específicos para el huésped inmunocomprometido que se definen en la invención, comprenden enfermedades linfoproliferativas de las células B y tumores de las células musculares lisas.
- 55 - Los tumores del huésped inmunocompetente, que se definen en la invención, comprenden patologías asociadas con la infección, tanto de las células mononucleares como de las epiteliales, tales como el linfoma de Hodgkin como el de Burkitt y de células no B, tales como las células T y las NK del linfoma y del carcinoma nasofaríngeo (NPC).

- 60 La invención se basa también en la observación, realizada en el contexto de la presente invención, respecto a un procedimiento para la determinación *in vitro* y *ex vivo* de la presencia o de una cantidad de por lo menos un anticuerpo que reconoce específicamente el polipéptido -X1-P-X2-P-X3-P-X4- (SEC ID nº 1), o variantes o isoformas de dicho polipéptido, en el que:

- 65 - X1 puede representar un aminoácido con la excepción de la prolina, o una secuencia desde cualesquiera de dos aminoácidos consecutivos a cualesquiera diecinueve aminoácidos consecutivos, en la que el último aminoácido no es una prolina.

- X2 y X3 pueden representar independientemente entre ellos un aminoácido seleccionado a partir de los aminoácidos conocidos, con excepción de la prolina.
- X4 puede representar un aminoácido, con excepción de la prolina, o una secuencia desde cualquiera de dos aminoácidos consecutivos a cualquiera de doce aminoácidos consecutivos, en la que el primer aminoácido no es una prolina.

Dicho anticuerpo puede encontrarse presente en una muestra biológica de un individuo afectado por una patología asociada con la infección por EBV.

Según la invención, el procedimiento no está relacionado con la determinación *in vitro* y *ex vivo* de la presencia o cantidad de por lo menos un anticuerpo que reconoce específicamente al polipéptido P125 ZEBRA (SEC ID nº 4), o los polipéptidos SEC ID nº 6 o SEC ID nº 7. En una forma de realización preferida, se da a conocer un procedimiento para la determinación *in vitro* y *ex vivo* de la presencia o cantidad de por lo menos un anticuerpo que anteriormente descrito, en el que dicho anticuerpo reconoce específicamente SEC ID nº 1, en el que:

X1 es -A1-A2-A3, seleccionándose A1 de entre F, Y, W, A2 de entre S, T, Y y A3 de entre G, A, V, L, I

X2 es seleccionado de entre Q, N, E, D,

X3 es seleccionado de entre G, A, V, L, I

X4 es B1-B2-B3-B4-, seleccionándose B1 de entre E, D, N, Q, B2 de entre N, Q, D, E, B3 de entre G, A, V, L, I, y B4 de entre F, Y, W, X1, X2, X3.

La infección se refiere también a un procedimiento para la determinación *in vitro* y *ex vivo* de la presencia o cantidad de por lo menos un anticuerpo que reconoce específicamente los polipéptidos SEC ID nº 5, SEC ID nº 8, pudiendo dicho anticuerpo encontrarse en una muestra biológica de un individuo que esté afectado por una patología asociada a la infección por EBV.

En una forma de realización preferida, la invención da a conocer un procedimiento para la determinación *in vitro* y *ex vivo* de la presencia o cantidad de por lo menos un anticuerpo que se ha descrito anteriormente, en el que dicho anticuerpo reconoce específicamente los polipéptidos SEC ID nº 5, que corresponden al polipéptido P100 ZEBRA.

Según la invención, la determinación de la presencia de por lo menos un anticuerpo, indica que si un anticuerpo puede detectarse en una muestra biológica, el anticuerpo se considera como presente en la muestra biológica. Por el contrario, si dicho anticuerpo no puede ser detectado mediante el procedimiento de la invención, se considera que el anticuerpo no se encuentra en la muestra biológica.

Por anticuerpo, se define en la invención la totalidad de las moléculas inmunológicas que se producen mediante las inmunoglobulinas de las células B (Ig). Entonces, según la invención, la totalidad de las inmunoglobulinas solubles e insolubles, tales como IgG, IgM, IgA e IgD, pueden detectarse. Según la invención, se detectan preferentemente los anticuerpos IgG.

Con respecto a la determinación de la cuantificación de la cantidad de por lo menos un anticuerpo, es conocido que, en la invención, se mide la cantidad de dicho anticuerpo.

La cantidad de anticuerpo se mide utilizando un protocolo clásico de cuantificación, en el que la cantidad del anticuerpo se compara con, por lo menos, dos muestras de control. Estas muestras de control se representan mediante, por lo menos, una muestra negativa y otra muestra positiva de control. El valor asociado a la medición de la cantidad del anticuerpo, es nulo en la muestra negativa de control, y el valor asociado con la medición de la cantidad del anticuerpo, es positivo en la muestra positiva de control. De esta forma, si el anticuerpo está ausente de la muestra biológica, el valor de la cuantificación es nulo. Por otra parte, si el anticuerpo está presente, el valor de la cuantificación es superior a cero. La presencia o la cantidad de anticuerpos, puede determinarse mediante cualquiera de los protocolos rutinarios que se utilizan habitualmente en la técnica.

Según el procedimiento de la exposición, los polipéptidos son reconocidos específicamente por lo menos por un anticuerpo que puede encontrarse en una muestra biológica de un individuo. Cuando se encuentra el anticuerpo, el reconocimiento se denomina específico, lo que significa que el anticuerpo interacciona sólo con dicho polipéptido; o las variantes o isoformas de los polipéptidos, pero no interacciona con otro polipéptido.

La exposición describe un procedimiento que permite detectar, en una muestra biológica, un anticuerpo IgG que reconoce específicamente el péptido formado por una secuencia SED ID nº 1.

La invención se refiere a un procedimiento para la detección, en una muestra biológica, de anticuerpos que reconocen específicamente polipéptidos que corresponden a SEC ID nº 5 o SEC ID nº 8.

El procedimiento que se da a conocer en la invención incluye, en una forma de realización específica, dos etapas por lo menos:

- a. el contacto de una muestra biológica de un paciente con, por lo menos, un polipéptido, preferentemente un polipéptido seleccionado entre el grupo formado por SEC ID nº 8 y SEC ID nº 5.
- b. la detección de la formación de un inmunocomplejo entre dicho polipéptido y un anticuerpo que puede encontrarse en dicha muestra biológica.

Opcionalmente, puede añadirse al procedimiento una etapa suplementaria. Esta etapa suplementaria permite la cuantificación de la cantidad del inmunocomplejo formado con la cantidad conocida del inmunocomplejo formado por las muestras de control. Esta cuantificación puede llevarse a cabo según un protocolo rutinario, por ejemplo, comparando el valor del inmunocomplejo formado, con los valores de inmunocomplejos conocidos, definiendo dichos valores de inmunocomplejos conocidos una curva estándar.

El procedimiento según la invención no considera la determinación *in vitro* y *ex vivo* de la presencia o cantidad de por lo menos un anticuerpo que reconoce específicamente al polipéptido P125 ZEBRA (SEC ID nº 4), o de los polipéptidos SEC ID nº 6 o SEC ID nº 7.

El término "inmunocomplejo" (también denominado "complejo antígeno-anticuerpo" describe el resultado de la interacción entre un epítipo (antígeno) con un anticuerpo dirigido contra el epítipo. Dicho antígeno implicado en la invención corresponde a los polipéptidos descritos anteriormente formados por secuencias aminoácidas SEC ID nº 5 y SEC ID nº 8. La detección de dicho inmunocomplejo se lleva a cabo con anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen específicamente dichos anticuerpos que pueden estar presentes en la muestra biológica del individuo. Este reconocimiento es directo.

Durante el procedimiento de detección, los anticuerpos que se utilizaron para ésta, son señalados habitualmente con un marcador. Los marcadores utilizados para la señalización de los anticuerpos se seleccionan entre los marcadores que se utilizan habitualmente por los expertos en la materia, seleccionándose en particular marcadores radioisotópicos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes luminiscentes, partículas magnéticas. La detección del inmunocomplejo formado se lleva a cabo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica anterior, como ELISA, inmunohistoquímica y citoquímica, inmunoprecipitación, transferencia Western y cualquier otro procedimiento inmunológico. Los procedimientos preferidos de la invención son ELISA y la inmunocromatografía.

El procedimiento de la presente invención consiste en poner en contacto la muestra biológica de un individuo, pudiendo dicha muestra biológica contener por lo menos un anticuerpo, con polipéptidos de la invención, es decir, polipéptidos formados por las secuencias aminoácidas SEC ID nº 5 y SEC ID nº 8.

Cuando dicha muestra biológica del individuo contiene un anticuerpo que puede reconocer dichos polipéptidos, puede formarse un inmunocomplejo.

Este inmunocomplejo se detecta utilizando anticuerpos que reconocen específicamente los anticuerpos contenidos en la muestra biológica, denominados también anticuerpos de detección.

Este inmunocomplejo puede cuantificarse eventualmente, comparando la cantidad de inmunocomplejo formado con la cantidad de los complejos de control. Estos complejos de control se obtienen utilizando cantidades conocidas de anticuerpos que reconocen específicamente los polipéptidos de la invención.

El procedimiento de la invención permite, por tanto, determinar si la muestra biológica contiene anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos que se han descrito en la invención. La presencia de los anticuerpos permite determinar que el individuo, si la muestra biológica fluye, está afectado por una patología asociada con la reactivación del virus EBV.

En una forma de realización preferida, la invención da a conocer un procedimiento para la determinación *ex vivo* e *in vitro* de la presencia o cantidad de por lo menos un anticuerpo, en el que el polipéptido es inmovilizado sobre un soporte, preferentemente sobre una placa de microtitulación.

En una forma de realización preferida, la invención describe un procedimiento para determinar la presencia de anticuerpos que pueden hibridizarse específicamente con los polipéptidos descritos anteriormente, en el que el procedimiento es un ensayo ELISA. Por tanto, los polipéptidos que se utilizan para capturar anticuerpos contenidos en la muestra biológica, se fijan a un soporte. Los soportes que habitualmente son utilizados por el experto en la materia incluyen perlas y placas. Más particularmente, los polipéptidos que se utilizan en la invención se unen preferentemente al fondo de una placa de microtitulación.

En una forma de realización preferida, la detección del anticuerpo descrito en el procedimiento de la invención, corresponde al fragmento Fc del anticuerpo, que puede encontrarse en la muestra biológica del individuo.

Según la invención, los anticuerpos de detección pueden interaccionar con la cadena Fc de los anticuerpos contenidos en la muestra biológica del individuo.

Asimismo, la exposición describe un equipo ELISA para la determinación "*in vitro* y *ex-vivo*" de la reactivación del EBV en un individuo, que incluye por lo menos un polipéptido seleccionado de entre el grupo constituido por SEC ID nº 1, donde X1 es seleccionado entre un aminoácido, con la excepción de prolina, o una secuencia aminoácida que incluye, por lo menos, de 2 a 19 aminoácidos, en la que el último aminoácido no es una prolina X2 y X3, independientemente entre ellos, corresponde a un aminoácido con excepción de la prolina, en el que el primer aminoácido no es una prolina, y X4 es seleccionado entre un aminoácido, con la excepción de prolina, o una secuencia aminoácida que comprende por lo menos de 2 a 12 aminoácidos, o SEC ID nº 5, o SEC ID nº 8, y sus variantes e isoformas, inmovilizados en un soporte que permite un ensayo inmunoenzimático (ELISA), siendo dicho soporte un soporte habitual utilizado en la técnica, tal como las perlas, las placas ELISA y las placas de microtitulación.

El equipo ELISA que se da a conocer en la invención, puede también contener materiales que permiten la detección de la formación del inmunocomplejo. Entonces, el equipo descrito anteriormente puede contener opcionalmente, por ejemplo, anticuerpos de detección que reconocen la cadena constante de inmunoglobulinas (fragmento Fc) de los anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos de detección se marcan con agentes utilizados habitualmente en la técnica tales como marcadores radioisotópicos, enzimas, agentes fluorescentes, partículas magnéticas.

Los ejemplos 1 a 5 y las figuras 1 a 2 siguientes ilustran la invención.

La figura 1 representa el alineamiento de la secuencia aminoácida del polipéptido P125 ZEBRA y sus polipéptidos P98, P99, P100 y P101. El número se basa en el número de la proteína ZEBRA completa.

La figura 2 representa el perfil de reactividad serológica de 8 pacientes con reactivación EBV. Los polipéptidos P98, P99, P100 y P101, derivados del polipéptido P125 ZEBRA, revistieron la placa de microtitulación. Se determinó la inmunorreactividad midiendo la absorbancia a 405 nm. El eje X representa respectivamente P98 (59-70), P99 (67-78), P100 (75-86), y P101 (83-95). El eje Y representa la absorbancia relativa en nanómetros. Los anillos representan a cada paciente.

Ejemplo 1: Reactividad de P100 comparada con los polipéptidos P98, P99 y P101.

Antecedentes:

En las solicitudes previas de la patente, se ha demostrado que el péptido derivado de P130 ZEBRA es eficiente para determinar la primo infección por EBV en pacientes, y que el péptido derivado de P125 ZEBRA es eficiente para determinar la reactivación de EBV en pacientes afectados por el carcinoma nasofaríngeo.

Para simplificar el ensayo inmunológico y reducir el coste de la producción peptídica, los inventores analizaron la inmunogenicidad de los péptidos derivados de P125 ZEBRA, generándose 4 polipéptidos a partir del péptido P125 ZEBRA, es decir, los polipéptidos P98, P99, P100 y P101. El alineamiento secuencial entre P98-P101 se muestra en la figura 1.

Los sueros de pacientes que presentan una activación del ciclo lítico de EBV, se ensayaron mediante la prueba ELISA, para determinar la reactividad P98-P101. Estos pacientes se consideran afectados por la infección activa por EBV, ya que los anticuerpos contra la proteína completa ZEBRA pueden detectarse en su suero.

ELISA:

Los pocillos de las placas de microtitulación se revisten con el antígeno de la siguiente forma:

- Los péptidos se aplican a cada pocillo en la proporción de 100 ng/100 µl (diluidos en tampón 50 mM carbonato-bicarbonato, pH 9,6).
- La placa se deja incubar durante la noche a 37°C.
- Las placas se lavan 3 veces con fosfato-tampón Tween al 0,1% (PBST), pH 7,4.
- El suero diluido se aplica a los pocillos en la proporción de 100 µl/pocillo.
- Se incuban los sueros durante 1 hora a 37°C, seguido por 3 lavados con PBST.
- Se añaden 100µl del conjugado anti-IgG humano/peroxidasa. Los conjugados IgG/peroxidasa se diluyen (en PBST) según las instrucciones del fabricante.

- La IgG/peroxidasa se incuba durante 30 minutos a 37⁰C, seguido por lavado con PBST.
- La visualización de la peroxidasa se lleva a cabo utilizando una solución de tetrametilbencidina (al 0,5%) y peróxido de hidrógeno (0,05%) en tampón citrato pH 4 (100 µl/pocillo). La duración de la reacción es de 10 minutos, protegida de la luz.
- La reacción se detiene añadiendo a cada pocillo una solución de ácido sulfúrico 1N.
- La lectura se lleva a cabo en un espectrofotómetro y la absorbancia se mide a 450 nm (A₄₅₀).

La inmunorreactividad de los polipéptidos P98-P101 se indica en la figura 2.

Interpretación

El suero de cada paciente se ensaya según el ELISA descrito anteriormente. Todos los pocillos de microtitulación que contienen polipéptidos P98, P99 o P101, muestran un nivel escaso de reactividad con los 8 sueros ensayados (absorbancia 405 nm bajo 0,5). Por el contrario, todos los sueros ensayados poseen una gran afinidad con el polipéptido P100, y muestran un aumento de la absorbancia de 7 veces comparados con P98-P99 y P101.

Por tanto, en el polipéptido P125 ZEBRA, sólo el polipéptido P100 posee una reactividad eficiente para la antiproteína ZEBRA completa.

Ejemplo 2: Reactividad de P100 comparada con los antígenos EA, VCA y EBNA de EBV.

Antecedentes:

En los protocolos de trasplantes, los pacientes son tratados con terapias inmunosupresoras para facilitar el injerto, e inmunizar contra el rechazo de éste.

Sin embargo, durante estos tratamientos, algunos pacientes con una infección latente por EBV muestran una reacción de éste, debida a la reducción de la eficiencia del sistema inmunitario.

Por tanto, el seguimiento de la reactivación del EBV es indispensable en pacientes de riesgo.

El diagnóstico *in vitro* que se utiliza habitualmente se basa en la detección de anticuerpos dirigidos contra las proteínas víricas VCA, EA y EBNA EBV.

Una reactivación del virus EBV (o infección secundaria) se define por la presencia de algunos anticuerpos dirigidos contra:

- VCA (> 1:320) y
- EA (> 1:40).

La presencia de estos anticuerpos puede detectarse simultáneamente con la presencia (o pre-existencia cuando ha sido posible establecerla) de los anticuerpos dirigidos contra EBNA (>1:10).

Al contrario, una infección latente se define por:

- la ausencia de anti-VCA IgM y
- la ausencia de
 - anti-EA IgG (<1:10),
 - anti-VCA IgG (<1:10) y
 - anti-EBNA IgG (<1:10).

Para simplificar, y reducir el coste de los diagnósticos de la reactivación de EBV, la presencia de anticuerpos anti-P100 se evalúa en pacientes afectados o no, con una patología asociada con una reactivación por EBV, y se compara con los marcadores previamente utilizados: EBNA, EA y VCA. Además, también se lleva a cabo la correlación entre la presencia de anticuerpos anti-P100 y el status patológico del paciente.

Pacientes:

Se ensayaron sueros de una cohorte de 19 pacientes (de 1 a 19) con reactivación por EBV, evaluándose la presencia de anticuerpos dirigidos contra péptidos inmunogénicos del virus EBV.

Los sueros se diluyeron a 1/100 en PBS (1M NaCl)-suero fetal de ternera al 5%-tampón Tween al 0,1% (PBSST).

La detección de los anticuerpos anti-P100 y de los anticuerpos anti-ZEBRA (que reconocen la proteína de fusión, completa, GST-ZEBRA), se lleva a cabo en ambos sueros de:

- pacientes trasplantados con reactivación por EBV (pacientes nº 1 a nº 15).
- pacientes sanos con reactivación por EBV (nº 16 a nº 19), y
- donantes de sangre sanos con infección latente (nº 20 a nº 22).

El ensayo se lleva a cabo con el ELISA que se ha descrito en el ejemplo 1.

Cada dilución sérica se ensaya por duplicado, por una parte contra el antígeno peptídico, y por otro lado contra los pocillos sin antígeno (pocillos de control).

El valor final adoptado para la absorbancia, por lo tanto, es el valor resultante de la diferencia entre la absorbancia promedio de los pocillos que contienen el antígeno y la absorbancia promedio de los pocillos de control (ΔA). La tabla 1 siguiente muestra el ensayo de los 22 distintos sueros.

Tabla 1. Detección de los anticuerpos dirigidos contra el polipéptido P100 derivado de ZEBRA, y GST ZEBRA en sueros de pacientes trasplantados (con reactivación por EBV). (+) indica una reactividad positiva. (-) indica una reactividad negativa.

Inmunofluorescencia indirecta (título de anticuerpos)				ELISA ZEBRA (promedio ΔA)	
Caso nº	Anti-VCA IgG	Anti-EA IgG	Anti-EBNA IgG	Anti-ZEBRA P100 IgG	Anti-GST ZEBRA IgG
1	1280	20	80	1,678 (+)	1,910 (+)
2	640	40	20	1,060 (+)	1,235 (+)
3	640	20	80	0,187 (-)	0,676 (+)
4	640	80	20	1,870 (+)	1,188 (+)
5	320	40	80	0,000 (-)	0,615 (+)
6	1280	1280	160	1,432 (+)	2,047 (+)
7	320	20	10	1,560 (+)	2,143 (+)
8	320	40	20	0,880 (+)	1,782 (+)
9	1280	320	20	0,930 (+)	2,074 (+)
10	1280	80	40	0,000 (-)	2,068 (+)
11	640	80	80	0,670 (+)	1,459 (+)
12	320	80	20	0,500 (+)	1,401 (+)
13	1280	1280	160	0,580 (+)	1,732 (+)
14	640	40	40	0,000 (-)	2,120 (+)
15	320	20	20	0,650 (+)	1,663 (+)
16	320	40	10	1,100 (+)	2,256 (+)
17	160	20	40	1,870 (+)	2,750 (+)
18	1280	20	40	0,700 (+)	1,940 (+)
19	160	20	160	1,590 (+)	2,861 (+)
20	20	<10	20	0,000 (-)	0,000 (-)
21	160	<10	20	0,000 (-)	0,242 (-)
22	80	<10	20	0,000 (-)	0,101 (-)

Interpretación:

En esta cohorte de 15 pacientes trasplantados con reactivación del EBV, 13 pacientes presentan una reactividad significativa utilizando polipéptidos ELISA P100 ZEBRA. Sólo 2 pacientes (paciente nº 5 y paciente nº 14) (aunque están presentes anticuerpos anti-VCA, anti-EBNA y anti-EA, lo que indica la reactivación de EBV), tienen una respuesta negativa a la presencia de anticuerpos anti EBV P100 ZEBRA.

Por tanto, la detección de la reactivación EBV utilizando el polipéptido P100 ZEBRA, proporciona unos resultados satisfactorios con una eficiencia del 87%.

La reactividad P100 ZEBRA de los sueros proporcionados por pacientes sanos afectados por la reactivación de EBV da lugar a resultados similares, ya que la totalidad de los 3 pacientes que se sometieron a ensayo eran positivos.

Como control, los donantes de sangre, sanos (con infección latente por EBV), presentan sueros que no reaccionan con el polipéptido P100 ZEBRA. Por tanto, los polipéptidos P100 ZEBRA pueden utilizarse fácilmente para detectar eficientemente en los pacientes la reactivación de EBV, siga o no al trasplante. El péptido P100 ZEBRA es específico, ya que no experimenta reacción cruzada con los sueros que se originan a partir de los pacientes EBV negativos o de los pacientes que presentan una infección latente por EBV.

Ejemplo 3: Estudio cinético de los anticuerpos anti-P100 comparados con los anticuerpos anti-VCA, anti-EA y anti-EBNAAntecedentes

La detección rápida de la reactivación del EBV constituye una rápida etapa para poder trabajar con los pacientes.

Hasta la fecha, sólo se investiga la elevación sérica de los anticuerpos EA, de los anticuerpos VCA y de los anticuerpos EBNA. Es bien conocido que la detección de IgG sigue a la de IgM.

Por tanto, se comparó la cinética de los anticuerpos anti-EA, anti-VCA y anti-EBNA, y, asimismo, los anticuerpos anti P100 ZEBRA.

El ZEBRA ELISA corresponde al ELISA al que se ha descrito en el ejemplo 1.

Se ensayaron 2 pacientes, y corresponde a dos pacientes que se habían sometido a un trasplante. Las muestras séricas se recogieron en el día 0, que corresponde al día del comienzo del protocolo del injerto.

Después de la cirugía, las muestras séricas se recuperaron recurrentemente entre los 10 y 120 días o a los 210 días.

La presencia de anti-EA, VCA, EBNA y P100 ZEBRA IgG se evalúa a los 120 días (paciente nº 1) o a los 210 días (paciente nº 2). Los resultados se indican en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2: Seguimiento de la infección activa por EBV de dos pacientes trasplantados. (+) indica una reactividad positiva. (-) indica una reactividad negativa.

Inmunofluorescencia indirecta (título de anticuerpos)				ELISA ZEBRA (promedio ΔA)	
Caso nº	Anti-VCA IgG	Anti-EA IgG	Anti-EBNA IgG	Anti-ZEBRA P100 IgG	Anti-ZEBRA P130 IgM
Paciente nº 1					
día 0	<10	<10	<10	0,000 (-)	0,514 (+)
día 10	<10	<10	<10	0,000 (-)	0,849 (+)
día 20	10	<10	<10	1,035(+)	1,479 (+)
día 40	80	10	<10	0,900 (+)	1,453 (+)
día 65	160	20	<10	0,700 (+)	1,656 (+)
día 120	320	20	<10	0,538 (+)	1,470 (+)
Paciente nº 2					
día 0	<10	<10	<10	0,000 (-)	0,000 (-)
día 10	<10	<10	<10	0,000 (-)	0,000 (-)
día 20	<10	<10	<10	0,000 (-)	0,333 (+)
día 30	<10	<10	<10	0,000 (-)	0,541 (+)
día 35	<10	<10	<10	0,000 (-)	0,721 (+)
día 55	10	<10	<10	0,986 (+)	1,520 (+)
día 90	80	10	<10	1,122 (+)	1,828 (+)
día 160	1280	20	<10	0,692 (+)	2,025 (+)
día 180	1280	40	<10	0,580 (+)	1,900 (+)
día 210	1280	80	<10	0,643 (+)	1,473 (+)

Interpretación:

Paciente nº 1: Este paciente presenta una infección activa por EBV antes de someterse a la cirugía, ya que en el día 0, IgM contra P130 se detectan significativamente.

Después de la cirugía, se detecta significativamente la infección activa por EBV en el día 20 con el polipéptido P100 ZEBRA, pero sólo con el polipéptido VCA en el día 40. En verdad, en el día 10, el título de anticuerpos IgG anti-VCA no es significativo para diagnosticar una infección activa por EBV, ya que el valor es próximo al valor negativo del umbral.

En este caso, el polipéptido P100 ZEBRA da lugar a un resultado significativo con respecto a la infección activa por EBV 10 días antes de la detección que se utiliza habitualmente de los anticuerpos anti-EA, anti-EBNA y anti-VCA.

Paciente nº 2: Este paciente es un paciente sin una infección activa por EBV antes de la cirugía, ya que en el día 0, los anticuerpos IgM contra P130 eran indetectables.

Después de la cirugía, se detectó significativamente una infección activa por EBV en el día 55 con el polipéptido P100 ZEBRA, pero sólo en el día 90 con el polipéptido VCA. Verdaderamente, en el día 55, el título IgG de anticuerpos anti-VCA no es significativo para diagnosticar una infección activa por EBV, ya que el valor está cercano al valor negativo del umbral.

En este caso, el polipéptido P100 ZEBRA proporcionó un resultado significativo con respecto a la infección activa por EBV 30 días antes de la detección utilizada habitualmente de los anticuerpos anti-EA, anti-EBNA y anti-VCA.

Estos resultados con respecto al seguimiento después de una cirugía de dos pacientes trasplantados, demuestran la detección precoz de los anticuerpos P100 ZEBRA en comparación con los anticuerpos contra VCA, EA y EBNA.

Ejemplo 4: Reactividad de P100 comparada con los antígenos EA,VCA, EBV y P125.

Se ensayan los sueros de una cohorte de 5 pacientes (1 a 5) con reactivación de EBV, evaluándose la presencia de anticuerpos dirigidos contra péptidos inmunogénicos del virus EBV.

Los sueros se diluyen hasta 1/100 en PBS (1M NaCl)-suero fetal de ternera al 5%-tampón Tween al 0,1% (PBSST).

La detección de anticuerpos anti-P100 y anti P125 se lleva a cabo en ambos sueros a partir de:

- pacientes con reactivación de EBV (pacientes nº 1 a nº 5),y
- donantes de sangre, sanos, con infección latente (nº 6).

Los resultados se representan en la tabla 3 siguiente.

Tabla 3: Detección de anticuerpos dirigidos contra el polipéptido P100 derivado de ZEBRA y el polipéptido P125 derivado de ZEBRA en sueros de pacientes (con reactivación de EBV).(+) indica una reactividad positiva, (-)indica una reactividad negativa.

Inmunofluorescencia indirecta (título de anticuerpo)				ELISA ZEBRA (promedio ΔA)	
Paciente nº	Anti-VCA IgG	Anti-EA IgG	Anti-EBNA IgG	Anti-ZEBRA P100 IgG	Anti-ZEBRA P125 IgG
1	160	20	40	2,456 (+)	1,870(+)
2	320	20	20	1,924 (+)	1,200 (+)
3	160	20	10	1,789 (+)	1,540 (+)
4	1280	20	40	1,400 (+)	0,700 (+)
5	160	20	160	2,670 (+)	1,590 (+)
6	20	<5	20	0,150 (-)	(0,000) (-)

Interpretación:

En esta cohorte de 5 pacientes con reactivación EBV, todos los pacientes presentan una reactividad significativa utilizando los polipéptidos ELISA P100 ZEBRA y P125 ZEBRA.

Como control, el donante de sangre sano (con una infección latente por EBV) posee un suero que no reacciona significativamente con el polipéptido P100 ZEBRA.

Además, el polipéptido P100 ZEBRA permite una detección de la reactivación de EBV significativamente más importante (entre 1.3x para el paciente 1 a 2x para el paciente 4) que la detección con el polipéptido P125.

El péptido P100 ZEBRA es específico, ya que no reacciona cruzadamente con el suero que se origina de los pacientes EBV negativos o de los pacientes con una infección latente por EBV.

Por tanto, P100 es más eficiente que P125 para la detección de la reactivación de EBV.

Ejemplo 5: ELISA utilizando el polipéptido P100 modificado (mP100; SEC ID nº 8)

El ELISA que incluye al mP100 es el siguiente:

mP100 está biotinilado en el extremo C.

Revestimiento:

5 El polipéptido mP100 se diluye a una concentración final de 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31, 0,155, 0,0775 µg/ml en PBS o en un tampón Carbonato/Bicarbonato (K_2CO_3 140 mM, $CaHCO_3$ 240 mM, pH 9,5). Se depositaron 100 µl de cada dilución en los pocillos de las placas, recubriéndose dichos pocillos con estreptavidina. Las placas se incubaron por la noche a 4-8°C en una atmósfera húmeda.

Lavados:

10 A cada pocillo se le añadió PBS-tween al 0,05%, y los pocillos se lavaron 3 veces.
Saturación (bloqueo)
Se añadieron 300 µl/pocillo de PBS-tween al 0,05%-BSA al 2%, incubándose las placas 1h a 37°C.

Ensayo:

15 Los sueros diluidos se depositaron en los pocillos, y la placa se incubó 1h30min, a 37°C.

Como control, se añadieron a los pocillos, por duplicado, 10µl del anticuerpo monoclonal anti -P125 (1,45 mg/ml) diluido 1000 veces en PBS-tween al 0,05%-BSA (1%)-SVF(5%).
20

Lavados:

Se añadió PBS-tween al 0,05% a cada pocillo, y los pocillos se lavaron 3 veces.

25 Anticuerpo secundario (IgG (H+L) de cabra anti fosfatasa alcalina de ratón (AP)):

IgG se diluyó 1/2000 en PBS-Tween al 0,05% - BSA (1%) - SVF (5%) (0,5%). 100 µl de la dilución se añadieron a cada pocillo. Se incubó la placa 1h30 min a 37°C.

30 Lavados: Se añadió PBS-tween al 0,05% a cada pocillo, lavándose los pocillos 3 veces.

Revelado (pNPP):

35 Se preparó pNPP (5 mg/ml) en tampón de dietanolamina (dietanolamina 0,097M, $MgCl_2$ 1 µM, pH 9,5). Se utilizaron 100 µl/pocillo de la solución de dietanolamina. Se llevó a cabo el revelado en la oscuridad durante 30-90 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl de NaOH 3N por pocillo.

DO:

40 Las placas se leyeron a 405 nm y 620 nm (referencia).

Con el péptido P100 modificado, se obtuvieron resultados similares a los alcanzados en los ejemplos 1-4 con el polipéptido P100.

45 **Bibliografía**

Epstein MA & Crawford DH, "Gamma herpes viruses: Epstein-Barr Virus", in Topley & Wilsons Microbiology & Microbial infections, Virology Eds BWJ Mahy & V Ter Meulen, 10th edition, Edward Arnold (publishers) 2005.

50 Klein G. "EBV and the tumor virus context", In Epstein - Barr virus ed by ES Robertson Caister Academic Press, Norfolk UK 2005

Cohen JI. "EBV and the tumor virus context", In Epstein - Barr virus ed by ES Robertson Caister Academic Press, Norfolk UK 2005

55 Thorley-Lawson DA, Miyashita EM, Khan G. Epstein-Barr virus and the B cell: that's all it takes. Trends Microbiol. 1996 May; 4(5):204-8

60 Speck SH, Chatila T, Flemington E. Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. Trends Microbiol. 1997 Oct; 5(10):399-405.

Feederle R, Kost M, Baumann M, Janz A, Drouet E, Hammerschmidt W, Delecluse HJ. The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. EMBO J. 2000 Jun 15; 19(12):3080-9.

65 Hong GK, Gulley ML, Feng WH, Delecluse HJ, Holley-Guthrie E, Kenney SC. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. J Virol. 2005 Nov; 79(22):13993-4003.

- Montone KT, Hodinka RL, Salhany KE, Lavi E, Rostami A, Tomaszewski JE. Identification of Epstein-Barr virus lytic activity in post-transplantation lymphoproliferative disease. *Mod Pathol*. 1996 Jun; 9(6):621-30.
- 5 Maréchal V, Meyohas MC, Joab I, Gaha S, Giot JF, Sergeant A, Nicolas JC. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to ZEBRA, an Epstein-Barr trans-activator. *Res Virol*. 1993 Sep-Oct; 144(5):397-404.
- Joab I, Triki H, de Saint Martin J, Perricaudet M, Nicolas JC. Detection of anti-Epstein-Barr virus trans-activator (ZEBRA) antibodies in sera from patients with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*. 1991 Ene; 163(1):53-6.
- 10 Brousset P, Drouet E, Schlaifer D, Icart J, Payen C, Meggetto F, Marchou B, Massip P, Delsol G. Epstein-Barr virus (EBV) replicative gene expression in tumour cells of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma in relation to CD4 cell number and antibody titres to EBV. *AIDS*. 1994 Mayo; 8(5):583-90.
- 15 Henle W and Henle G. Clinical spectrum of EBV infection. In the Human herpesviruses: an interdisciplinary perspective.
- Nahmias, Dowdle and Schinazi eds Elsevier New-York, 1981.
- 20 Dardari R, Menezes J, Drouet E, Joab I, Benider A, Bakkali H, Kanouni L, Jouhadi H, Benjaafar N, Gueddari BE, Hassar M, Khyatti M. Analyses of the prognostic significance of the Epstein-Barr virus transactivator ZEBRA protein and diagnostic value of its two synthetic peptides in nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Virol*. 2008 Feb; 41(2):96-103. Epub 2007 Nov 19.
- 25 Drouet E, Brousset P, Fares F, Icart J, Verniol C, Meggetto F, Schlaifer D, Desmorat-Coat H, Rigal-Huguet F, Niveleau A, Delsol G. High Epstein-Barr virus serum load and elevated titers of anti-ZEBRA antibodies in patients with EBV-harboring tumor cells of Hodgkin's disease *J Med Virol*. 1999 Abr; 57(4):383-9.
- Touge C, Agawa H, Sairenji T, Inoue Y. High incidence of elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in patients with uveitis. *Arch Virol*. 2006 Mayo; 151(5):895-903.
- 30 Tedeschi R, Bloigu A, Ogmundsdottir HM, Marus A, Dillner J, dePaoli P, Gudnadottir M, Koskela P, Pukkala E, Lehtinen T, Lehtinen M. Activation of maternal Epstein-Barr virus infection and risk of acute leukemia in the offspring. *Am J Epidemiol*. 2007 Ene 15; 165(2):134-7.
- 35 Dardari R, Hinderer W, Lang D, Benider A, El Gueddari B, Joab I, Benslimane A, Khyatti M. Antibody responses to recombinant Epstein-Barr virus antigens in nasopharyngeal carcinoma patients: complementary test of ZEBRA protein and early antigens p54 y p138. *J Clin Microbiol*. 2001 Sep; 39(9):3164-70.

Listado de secuencias

- <110> University Joseph Fourier DROUET, Emmanuel
- 5 <120> Utilización del péptido sintético derivado de la proteína Zebra para el diagnóstico *in vitro* de la reactivación del virus de Epstein-Barr (EBV).
- <130> WOB 07 CS UJF P125
- 10 <150> EP 08 290 224.8
<151> 2008-03-10
- <160> 8
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 7
<212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Xaa = todos los aminoácidos, excepto Pro
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido, excepto Pro
- 30 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido, excepto Pro
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido, excepto Pro
- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido, excepto Pro
- 45 <400> 1
- Xaa Pro Xaa Pro Xaa Pro Xaa
1 5
- <210> 2
- 50 <211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> derivado de la proteína Zebra del virus de Epstein-Barr
- <400> 2
- Gly Gln Leu Thr Ala Tyr His Val Ser Thr Ala Pro Thr Gly Ser Trp
1 5 10 15
- Phe Ser Ala
- 60 <210> 3
<211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> derivado de la proteína Zebra del virus de Epstein-Barr

 <400> 3

 Glu Asn Ala Tyr Gln Ala Tyr Ala Pro Gln Leu Phe
 1 5 10
 10
 <210> 4
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> derivado de la proteína Zebra del virus de Epstein-Barr

 <400> 4
 20
 Gly Gln Leu Thr Ala Tyr His Val Ser Thr Ala Pro Thr Gly Ser Trp
 1 5 10 15

 Phe Ser Ala Pro Gln Pro Ala Pro Glu Asn Ala Tyr Gln Ala Tyr Ala
 20 25 30

 Pro Gln Leu Phe
 35

 <210> 5
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> derivado de la proteína Zebra del virus de Epstein-Barr
 30
 <400> 5

 Phe Ser Ala Pro Gln Pro Ala Pro Glu Asn Ala Tyr
 1 5 10
 35
 <210> 6
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Virus de Epstein-Barr
 40
 <400> 6

 Met Met Asp Pro Asn Ser Thr Ser Glu Asp Val Lys Phe Thr Pro Asp
 1 5 10 15

 Pro Tyr Gln Val Pro Phe Val Gln Ala Phe Asp Gln Ala Thr Arg Val
 20 25 30

 Tyr Gln Asp Leu Gly Gly Pro Ser Gln Ala Pro Leu Pro Cys Val Leu
 35 40 45

ES 2 375 095 T3

Trp Pro Val Leu Pro Glu Pro Leu Pro Gln Gly Gln Leu Thr Ala Tyr
50 55 60

His Val Ser Thr Ala Pro Thr Gly Ser Trp Phe Ser Ala Pro Gln Pro
65 70 75 80

Ala Pro Glu Asn Ala Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Phe Pro
85 90 95

Val Ser Asp Ile Thr Gln Asn Gln Gln Thr Asn Gln Ala Gly Gly Glu
100 105 110

Ala Pro Gln Pro Gly Asp Asn Ser Thr Val Gln Thr Ala Ala Ala Val
115 120 125

Val Phe Ala Cys Pro Gly Ala Asn Gln Gly Gln Gln Leu Ala Asp Ile
130 135 140

Gly Val Pro Gln Pro Ala Pro Val Ala Ala Pro Ala Arg Arg Thr Arg
145 150 155 160

Lys Pro Gln Gln Pro Glu Ser Leu Glu Glu Cys Asp Ser Glu Leu Glu
165 170 175

Ile Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Cys Arg Ala Lys
180 185 190

Phe Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser
195 200 205

Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Lys Gln Met Cys Pro Ser
210 215 220

Leu Asp Val Asp Ser Ile Ile Pro Arg Thr Pro Asp Val Leu His Glu
225 230 235 240

Asp Leu Leu Asn Phe
245

5

<210> 7
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Derivado de la proteína Zebra del virus de Epstein Barr (Zebra delta N 24)

<400> 7

15

Ala Phe Asp Gln Ala Thr Arg Val Tyr Gln Asp Leu Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15

ES 2 375 095 T3

Gln Ala Pro Leu Pro Cys Val Leu Trp Pro Val Leu Pro Glu Pro Leu
20 25 30

Pro Gln Gly Gln Leu Thr Ala Tyr His Val Ser Thr Ala Pro Thr Gly
35 40 45

Ser Trp Phe Ser Ala Pro Gln Pro Ala Pro Glu Asn Ala Tyr Gln Ala
50 55 60

Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Phe Pro Val Ser Asp Ile Thr Gln Asn Gln
65 70 75 80

Gln Thr Asn Gln Ala Gly Gly Glu Ala Pro Gln Pro Gly Asp Asn Ser
85 90 95

Thr Val Gln Thr Ala Ala Ala Val Val Phe Ala Cys Pro Gly Ala Asn
100 105 110

Gln Gly Gln Gln Leu Ala Asp Ile Gly Val Pro Gln Pro Ala Pro Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ala Arg Arg Thr Arg Lys Pro Gln Gln Pro Glu Ser Leu
130 135 140

Glu Glu Cys Asp Ser Glu Leu Glu Ile Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val
145 150 155 160

Ala Ser Arg Lys Cys Arg Ala Lys Phe Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr
165 170 175

Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu
180 185 190

Leu Leu Lys Gln Met Cys Pro Ser Leu Asp Val Asp Ser Ile Ile Pro
195 200 205

Arg Thr Pro Asp Val Leu His Glu Asp Leu Leu Asn Phe
210 215 220

<210> 8

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Derivado de la proteína Zebra del virus de Epstein-Barr

<400> 8

Phe Ser Ala Pro Gln Pro Ala Pro Glu Asn Ala Tyr Gly Ser Lys
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización del fragmento ZEBRA P100 constituido por la secuencia SEC ID nº 5 o SEC ID nº 8, para el cribado *in vitro* y *ex vivo* de la reactivación del virus EBV en una muestra biológica de un individuo afectado por una patología asociada con la infección por EBV.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que las patologías asociadas con las infecciones por EBV se seleccionan de entre el grupo que comprende: tumores específicos para el huésped inmunocomprometido, tumores del huésped inmunocompetente y el síndrome vírico relacionado con EBV.
- 15 3. Procedimiento para la determinación *in vitro* y *ex vivo* de la presencia o cantidad de por lo menos un anticuerpo que reconoce específicamente el polipéptido constituido por SEC ID nº 5 o SEC ID nº 8, pudiendo dicho anticuerpo estar presente en una muestra biológica de un individuo afectado por una patología asociada con la infección por EBV.
- 20 4. Procedimiento para la determinación *in vitro* y *ex vivo* de la presencia o cantidad de por lo menos un anticuerpo según la reivindicación 3, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
 - a. poner en contacto la muestra biológica de dicho paciente con dicho polipéptido,
 - b. detectar la formación de un inmunocomplejo entre dicho polipéptido y dicho anticuerpo que puede estar presente en dicha muestra biológica, y
 - 25 c. cuantificar opcionalmente la cantidad del inmunocomplejo formado.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el polipéptido se inmoviliza sobre un soporte, preferentemente una placa de microtitulación.
6. Procedimiento según la reivindicación 4 ó 5, en el que dicha detección se lleva a cabo utilizando un anticuerpo que puede detectar el fragmento Fc de dicho anticuerpo.
- 35 7. Kit ELISA para la determinación *in vitro* y *ex vivo* de la reactivación de EBV en un individuo, que comprende:
 - por lo menos un polipéptido constituido por la secuencia aminoácida SEC ID nº: 5, o SEC ID nº:8, inmovilizado en una placa ELISA, y
 - opcionalmente, unos anticuerpos que reconocen el fragmento Fc de los anticuerpos humanos.

Figura 1: Alineamiento secuencial entre los péptidos P125, P98, P99, P100 y P101 derivados de ZEBRA.

P125	G	QLTAYHVSTA	PTGSWFSAPO	PAPENAYQAY	APQLF
P98	G	QLTAYHVSTA	P-----	-----	-----
P99	-	-----STA	PTGSWFSA--	-----	-----
P100	-	-----	-----FSAPO	PAPENAY---	-----
P101	-	-----	-----	---ENAYQAY	APQLF
	60	70	80	90	

Figura 2: Respuesta serológica (IgG) contra los polipéptidos P98, P99, P100 y P101 derivados del polipéptido P125 ZEBRA con respecto a los pacientes diagnosticados de reactivación EBV positivo

