

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 033**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2012 PCT/FR2012/050926**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12153031**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2012 E 12725057 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2705369**

54 Título: **Procedimiento para la detección y el serotipaje precoz del virus del dengue**

30 Prioridad:

06.05.2011 FR 1153916

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.02.2019

73 Titular/es:

**BIOMERIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy-l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

**BEDIN, FRÉDÉRIC;
BUSSET, SANDRINE y
STEIDEL, MARINE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 701 033 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección y el serotipaje precoz del virus del dengue

5 La presente invención tiene por objeto un procedimiento para la detección y el serotipaje precoz del virus del dengue.

Estos 30 últimos años, el dengue, una enfermedad viral transmitida por los mosquitos hematófagos urbanos de tipo *Aedes*, se ha extendido a través del mundo de manera inquietante. Es actualmente un verdadero problema de salud pública para más de un centenar de países situados en la zona subtropical, particularmente en las zonas pacífico-oeste, Sudamérica y sudeste asiático. La emergencia de la enfermedad se debe en gran parte a la explosión demográfica y a la urbanización anárquica. Las anomalías climáticas tienen también un papel significativo. A este respecto, el dengue podría emerger en las regiones occidentales del globo hasta ahora no afectadas por el virus. Así, *Aedes albopictus*, uno de los vectores de la enfermedad, se ha encontrado recientemente en el norte de Italia y en el sur de Francia. Últimamente, casos de dengue autóctonos han sido señalizados en el sur de Francia. Se estima que cerca de 3 mil millones de personas están expuestas a los riesgos de dengue. Cerca de un millón de hospitalizaciones se censan anualmente y los fallecimientos se cuentan por miles. Los niños son las principales víctimas de la enfermedad.

20 El virus del dengue es un virus envuelto con ARN monocatenario de polaridad positiva de la familia de los Flaviviridae. El genoma del virus (11000 nucleótidos) codifica una poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos que sufren una escisión co- y post-traducciona que da como resultado proteínas estructurales (C, prM, E) y proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Existen 4 estereotipos virales (DV1 a DV4), que pueden coexistir en zonas de endemia. Existe aproximadamente un 70% de homología de secuencias entre los diferentes serotipos. La infección por un serotipo dado confiere una inmunidad a largo plazo para este serotipo. La protección cruzada dura sólo algunos meses: la reinfección es por lo tanto posible con un serotipo diferente. La manifestación clínica más común (fiebre de dengue o DF) es un estado febril de algunos días acompañado en particular de cefaleas severas, lumbalgias, dolores musculares y articulares, que regresan espontáneamente sin tratamiento específico. Sin embargo, se asiste a veces a complicaciones que conducen a un dengue hemorrágico (o DHF). En este caso, se nota un aumento transitorio de la permeabilidad vascular y una fuga del plasma responsable de una trombopenia y de una coagulopatía. En los casos más severos, la fuga de plasma puede conllevar un choque hipovolémico mortal (SCD, Síndrome de Choque por Dengue) si el paciente no se trata rápidamente. Unos padecimientos hepáticos y neurológicos, raros pero mortales, están también asociados a la gravedad de la enfermedad. Variable según las epidemias, el porcentaje de mortalidad puede alcanzar el 5% de los casos declarados de DHF. Este porcentaje puede aumentar hasta el 20% sin un tratamiento hospitalario o tratamientos adaptados.

El 90% de los casos de DHF tiene lugar durante una infección secundaria por un serotipo heterólogo, y el 10% durante una infección primaria, habitualmente en lactantes de 6 meses a 1 año de edad. Existen varios factores que influyen sobre la severidad de la infección, tales como los factores del hospedante, el serotipo y el genotipo del virus, el orden de sucesión de los virus infectantes, la calidad y la cantidad de anticuerpos con reacciones cruzadas y la respuesta CD4/CD8. En la actualidad, no se conocen todavía con certeza las causas exactas de la aparición de la DHF. En una primera hipótesis, son las fuerzas de selección ejercidas sobre el virus que conducen a la selección de un "super-virus". Unos estudios han mostrado una correlación entre la carga viral y la severidad de la enfermedad. Unos estudios han implicado también las proteínas virales E y NS1 en la patogenicidad. La secuencia de los serotipos infectantes, el intervalo entre cada infección son también determinantes clínicos importantes. Así, una infección secundaria por los serotipos 1 y 2 está frecuentemente asociada a una frecuencia elevada de DHF. Hasta ahora, ningún determinante específico de la virulencia se ha puesto en evidencia con certeza. Una infección secundaria con un serotipo diferente está significativamente asociada a la gravedad de la enfermedad. Es la base de la segunda hipótesis, la hipótesis de facilitación de la infección por unos anticuerpos anti-dengue de baja afinidad, que no se ha podido confirmar jamás *in vivo* en ausencia de modelo animal.

Se basa en la presencia de anticuerpos neutralizantes de baja afinidad que facilitan la infección *in vitro* de los macrófagos a través de su receptor Fc a las inmunoglobulinas. La presencia de los complejos inmunes favorece por otro lado la activación del complemento. La activación y la proliferación excesiva de los linfocitos T CD4 y CD8+ memorias conllevarían la producción incrementada de citoquinas y de mediadores celulares. La concomitancia de estos diferentes elementos sería responsable de la patogenia. Si se admite claramente la demostración del papel clave de la activación linfocitaria y de la secreción de mediador en la fisiopatología, es muy difícil mostrar una correlación clara con la aparición de la DHF.

Los factores genéticos tienen probablemente una función, ya que varios estudios han mostrado la función o bien protectora o bien patógena de algunos alelos HLA clase 1. Sin embargo, los resultados son bastante contradictorios y varían según el origen de las extracciones.

En la actualidad, no existen vacunas comercializadas contra el virus del dengue y los únicos tratamientos disponibles son unos tratamientos sintomáticos. En este contexto, es importante poder vigilar las epidemias y

pronosticar los casos severos para un tratamiento hospitalario adaptado ^[1, 2, 3].

El diagnóstico del dengue se basa en la detección de los elementos virales o de los anticuerpos específicos. Entre las técnicas de virología clásicas, el aislamiento del virus por infección de células y examen por inmunofluorescencia sigue siendo una de las técnicas de referencia. Sin embargo, es técnicamente muy pesada de realizar.

Los métodos moleculares (RT-PCR, etc.) permiten la detección del virus y el serotipaje. Entre los métodos serológicos, el MAC-ELISA (ELISA de captura de anticuerpos IgM) que mide las IgM específicas, se utiliza para detectar las infecciones primarias. Sin embargo, necesitan asociarse a una detección de las IgG específicas para discriminar infecciones primarias y secundarias. Pero, los anticuerpos aparecen sólo 4-5 días después del principio de los síntomas y además es necesario disponer de dos extracciones a fin de poner en evidencia una seroconversión.

La proteína NS1 se ha caracterizado en 1985 por G.W Smith^[4]. Es una glicoproteína altamente conservada en los flavivirus. A pesar de que su función no sea totalmente elucidada, intervendría en particular en la replicación del virus y en la patogenicidad. Está sintetizada en forma de monómero. Su maduración se asocia a una dimerización. La proteína madura se transporta hacia la membrana plasmática y después secretada en el medio extracelular en el que se encuentra en forma de dímeros y de multímeros, principalmente de pentámeros y de hexámeros^[6].

La búsqueda de proteína NS1 en muestras sanguíneas de paciente permite determinar una infección reciente, pero no permite distinguir entre dengue primario y secundario, elemento importante, ya que la DHF se asocia principalmente a una segunda infección por un serotipo diferente.

Se han desarrollado unos métodos de tipo ELISA para poner en evidencia la presencia de la proteína viral NS1 y diagnosticar un dengue a partir de la aparición de la fiebre (véase por ejemplo el documento FR2794864A1). En estos métodos, la utilización de mezclas de anticuerpos monoclonales y/o de anticuerpos policlonales seleccionados por su afinidad frente a la proteína NS1 permiten una detección precoz, durante la fase clínica de la infección.

El problema de estos métodos ELISA es que necesitan la utilización de al menos dos anticuerpos, un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección dirigidos contra unos epítomos diferentes de la proteína, lo que implica unas obligaciones en la selección de las materias primas y unas obligaciones técnicas en la realización del ensayo. Además, estos métodos no permiten distinguir los diferentes serotipos, mientras que se establece que una infección secundaria por los serotipos 1 y 2, por ejemplo, se asocia frecuentemente a una frecuencia elevada de DHF.

Asimismo, es importante disponer de un método de detección más simple que permite detectar precozmente la proteína NS1 en una muestra para establecer el diagnóstico de una infección, ya sea primaria o secundaria, y además distinguir los diferentes serotipos, en particular los serotipos asociados a una frecuencia elevada de DHF.

El documento WO2010/043973 se refiere a biomarcadores a base de proteína y combinaciones de biomarcadores que se utilizan para calificar el estado del dengue en un paciente. Más precisamente, los biomarcadores se utilizan para clasificar una muestra objeto como infectada o no por dengue. Los biomarcadores pueden detectarse por espectrometría de masas SELDI.

La presente invención responde a las problemáticas discutidas anteriormente mediante un procedimiento que permite al mismo tiempo una detección precoz y específica de la proteína NS1 en una muestra biológica y distinguir los diferentes serotipos.

Asimismo, la presente invención tiene en particular como objeto un procedimiento para poner en evidencia *in vitro* una infección por un virus del dengue en un individuo que comprende las etapas de:

poner en contacto una muestra sanguínea del individuo con un ligando específico de la proteína NS1 de dicho virus del dengue para capturar la proteína NS1, si está presente en la muestra sanguínea, siendo dicho ligando inmovilizado sobre un soporte sólido,

poner en evidencia la presencia de la proteína NS1 por una lectura por espectrometría de masas, y

si la proteína NS1 se pone en evidencia, concluir que el individuo se ha infectado por el virus del dengue.

La espectrometría de masa es un método que utiliza un espectrómetro de masa para detectar unos iones en fase gaseosa. Un espectrómetro de masa está constituido de una fuente para ionizar en estado gaseoso las moléculas a analizar, por ejemplo un láser, y de un analizador para determinar la naturaleza de la masa utilizando diferentes principios físicos. A título de ejemplo, se pueden citar como principios físicos el tiempo de vuelo o TOF (Time Of Flight), trampa de iones, la resonancia iónica ciclotrónica, el filtro cuadrípulo, el sector magnético, el sector electroestático.

Los espectrómetros de masa de tipo MALDI-TOF son unos espectrómetros de masa que acoplan una fuente de

ionización láser asistida por una matriz (MALDI: *Matrix-Assisted laser Desorption/Ionisation*) a un analizador a tiempo de vuelo (TOF). Históricamente, los analizadores por tiempo de vuelo, que necesitan una fuente de ionización pulsada, se acoplaban únicamente con las fuentes MALDI. Actualmente, las fuentes MALDI pueden acoplarse a otros tipos de analizadores (por ejemplo un analizador FT-ICR) y el analizador por tiempo de vuelo a otras fuentes (por ejemplo una fuente electrospray en un instrumento ESI-QTOF).

El SELDI-TOF MS (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry*) es un enfoque elaborado por Huychens *et al.* [7]. En esta técnica, se retienen proteínas sobre superficies cromatográficas dispuestas en tiras y se ionizan después mediante la técnica MALDI y se detectan por TOF MS (*Time Of Fly Mass Spectrometry*). Las superficies cromatográficas se conciben para seleccionar las proteínas presentes en una mezcla compleja, sobre criterios de hidrofobicidad, de carga, de afinidad, etc. La masa molecular de las proteínas retenidas por las superficies cromatográficas se puede medir mediante TOF MS.

Así, en un modo de realización particular de la invención, se pone en contacto la muestra sanguínea del individuo con un ligando específico de la proteína NS1 de dicho virus del dengue para capturar la proteína NS1, si está presente en la muestra, inmovilizándose el ligando sobre un soporte sólido,

se somete el soporte a una lectura por espectrometría de masa para poner en evidencia la presencia de la proteína NS1, y

si la proteína NS1 está puesta en evidencia, se concluye que el individuo se ha infectado por el virus del dengue.

Además, el hecho de que el método de detección por espectrometría de masa, en particular MALDI-TOF y SELDI-TOF, permite diferenciar los diferentes serotipos, éste presenta además la ventaja de necesitar sólo la utilización de un único ligando específico en captura, para una especificidad al menos comparable con aquella obtenida por un método de ELISA clásico que utiliza al menos dos anticuerpos específicos dirigidos contra dos epítomos diferentes (un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección) y para una sensibilidad próxima de aquella obtenida mediante un método ELISA.

El ligando específico de la proteína NS1 se selecciona entre los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y las proteínas de afinidad a las propiedades competitivas (nanofitines™). Preferentemente, el ligando es un anticuerpo tal como se define en el párrafo "Definiciones", en particular, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal altamente purificado por afinidad frente a la proteína NS1. Por ejemplo, el ligando es un anticuerpo monoclonal específico de la forma monomérica, de la forma dimérica y de la forma hexamérica de la proteína NS1.

El ligando es específico de al menos un serotipo del virus del dengue, en particular de dos serotipos del virus.

En particular, el ligando se inmoviliza sobre un soporte tal como:

una tira, una placa, una bola, un chip, una fase cromatográfica.

Definiciones

Muestra sanguínea significa sangre total, suero o plasma.

El ligando es preferentemente un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal altamente purificado policlonal frente a la proteína NS1 o una proteína de afinidad con propiedades competitivas (nanofitine™).

Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse por inmunización de un animal con el inmunógeno apropiado, seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpos de los otros constituyentes del suero, en particular por cromatografía de afinidad sobre una columna sobre la cual está fijado un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante la técnica de los hibridomas, cuyo principio general se recuerda a continuación.

En un primer tiempo, se inmuniza un animal, generalmente un ratón con el inmunógeno apropiado, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra este antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos se fusionan después con células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a unos hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal, cuyas propiedades de reconocimiento frente a la proteína podrán ensayarse por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia (transferencia Western) en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados son después purificados, en particular según la técnica de

cromatografía de afinidad descrita anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales pueden también ser unos anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, por técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

5 Las nanofitines (nombre comercial) son pequeñas proteínas que, como los anticuerpos, son capaces de unirse a una diana biológica que permite así detectarla, capturarla o simplemente determinarla dentro de un organismo.

Figuras

10 La figura 1 representa las secuencias de aminoácidos reconocidas por los anticuerpos 12H9G9, 13E1B3, 10G3G13 y 9C9A9. El gen NS1 sintético se ilustra con su péptido señal (péptido señal del activador del plasminógeno tisular – rectángulo blanco) y su cola polihistidina (rectángulo negro) necesarias, respectivamente, para la excreción y para la purificación de NS1. Los aminoácidos identificados por cartografía de epítopos son identificados bajo la secuencia específica enumerada de 1 a 20 (anticuerpos 12H9G9, 13E1B3, 10G3G13 y 9C9A9). Los sitios potenciales de *N*-glicosilación se identifican mediante “V”.

15 La figura 2 ilustra la cinética de detección de NS1 en SELDI-TOF MS con el anticuerpo 12E1B3 sobre unas células Vero en cultivo infectadas por el serotipo 3 del virus del dengue. Los resultados se presentan separadamente para el sobrenadante de cultivo y para el lisado celular. La figura 2A ilustra los resultados obtenidos sobre el sobrenadante de cultivo, la figura 2B representa los resultados obtenidos sobre el lisado celular y la figura 2C ilustra los resultados obtenidos con los controles. Las figuras 2A y 2B ilustran los resultados de las mediciones efectuadas respectivamente a 90 minutos (a); 6 horas (b), 12 horas (c), 24 horas (d), 48 horas (e); 5 días después de la infección (f), 7 días después de la infección (g); control sin virus, 7 días después de la infección. El valor asociado a los picos corresponde a la masa reportada a la carga (m/z) después de la calibración con un estándar interno. La figura 2C ilustra los resultados de las mediciones obtenidas sobre unos controles complementarios: (a) proteína recombinante NS1 (50 ng), (b) sobrenadante de cultivo de células Vero infectadas por el virus del dengue de serotipo 3 (7 días después de la infección), (c) sobrenadante de cultivo de células Vero no infectadas, (d) lisado de células Vero infectadas por el virus del dengue de serotipo 3 (7 días después de la infección), (e) lisado de célula Vero no infectadas y (f) medio de cultivo. El valor asociado a los picos corresponde a la masa reportada a la carga (m/z), después de la calibración con un estándar interno. La figura 2D ilustra los resultados obtenidos por un procedimiento de tipo sándwich ELISA. Los histogramas ilustran los ELISA de captura de NS1 efectuados sobre los lisados de células Vero (en blanco) y los sobrenadante de cultivo (en negro) de estas mismas células extraídas respectivamente a 90 minutos, 6, 12, 24, 48 horas, 5 y 7 días después de la infección. Los valores corresponden a la densidad óptica (OD) leída a 450 nm (media de 2 pocillos para 2 experimentos independientes).

20 La figura 3 ilustra la detección de la proteína NS1 en SELDI-TOF MS sobre unos plasmas (serotipos 3) extraídos a diferentes tiempos después del inicio de los síntomas; a) sobrenadante de cultivo de células Vero infectadas por el virus del dengue de serotipo 3 (2 días post-infección); b) lisado de células Vero infectadas por el virus del dengue de serotipo 3 (2 días post-infección); c) sobrenadante de cultivo de células Vero no infectadas; d) lisado de células Vero no infectadas; e) proteína recombinante NS1 (50 ng); f) plasma sano (“healthy”); (g a j) extracciones en series de plasmas que padecen dengues a 2, 3, 4, 5 días después de la aparición de los síntomas (p2 a p5). El valor asociado a los picos corresponde a la masa reportada a la carga (m/z) después de la calibración con un estándar interno. Los histogramas ilustran unos ELISA de captura de la NS1 efectuados sobre las mismas muestras. Los valores corresponden a la densidad óptica leída a 450 nm (media de 2 pocillos para 2 experimentos independientes).

Ejemplos

Ejemplo 1: expresión y purificación de una proteína NS1 recombinantes

50 El gen NS1 del virus del dengue se ha obtenido reconstituyendo, por oligonucleótidos solapantes, un gen de la proteína NS1, teniendo en cuenta unos aminoácidos presentes sobre los serotipos 3 y 1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VirusVariation/>). Los codones se optimizaron para una expresión en unos sistemas de expresión eucariotas. Un péptido líder, que corresponde al péptido líder del activador del plasminógeno tisular, se añadió en 5' del gen a fin de permitir una excreción de la proteína sintetizada^[6]. Se ha añadido cola una poli-histidina 3', a fin de facilitar la purificación de la proteína sintetizada mediante un método de afinidad metalquelato. Se han añadido también unos sitios de restricción *Xho*1 y *Xba*1 respectivamente en 5' y 3' del gen. El gen así reconstituido se ha insertado en los sitios *Xho*1-*Xba*1 de un plásmido de expresión eucariótico de tipo pCI (Promega-Biotech) bajo la dependencia de un promotor de tipo “genes precoces” del CitoMegaloVirus. La proteína NS1 está expresada gracias a una técnica de expresión transitoria en el sistema celular eucariota 293T (ATCCIDCRL-11268): unas células 293T al 70% de confluencia se ponen en contacto con el plásmido recombinante pCI-NS1 en presencia de un transfectante (Lipofectamine 2000, Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Setenta y dos horas después de la transfección, el sobrenadante de cultivo se recupera y se centrifuga a baja velocidad para eliminar los restos celulares (1500 g / 5 minutos). El sobrenadante preclarificado se purifica entonces. Se pone en contacto durante una noche a 6°C, bajo agitación, con una resina NiNTA (Qiagen). Al día siguiente, la resina se lava y después se eluye la proteína NS1 en presencia de tampón salino que contiene 250 µM de imidazol

según las recomendaciones de *The Quiaexpressionist (A handbook for high level expression and purification of his-tagged protein, fifth edition Qiagen)*. El imidazol se elimina después mediante una diálisis durante la noche contra Tris-Buffer Salina pH=7,4 (TBS) en un casete de diálisis de porosidad 3500 MWCO (Slide-A-Lyzer, Thermo-Scientific). La proteína dializada se concentra eventualmente por paso sobre un conjunto de soporte de tipo Ultrafree (Millipore). La proteína obtenida es de una pureza superior al 90%. El tamaño estimado en transferencia Western, revelado con un anticuerpo anti-poli-histidina (PentaHis antibody, Qiagen) después de la migración sobre un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes, es de aproximadamente 45 000 Daltons, es decir el tamaño esperado para la proteína monomérica. Una hidrólisis de los N-glicanos por PNGaseF (New England Biolabs) seguida de una electroforesis sobre gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes confirme, mediante una bajada de la masa molecular aparente, que la proteína obtenida está bien glicosilada. La proteína se cuantifica por micro-BCA (Thermo-Scientific).

Ejemplo 2: inmunizaciones de los ratones y de los conejos y obtención de los anticuerpos

Inmunización de los ratones: El protocolo de inmunización de los ratones consistió en 5 inyecciones de 5 ratones Balb/C hembras con 50 microgramos de proteína NS1 recombinante purificada según el ejemplo 1 en presencia de adyuvante completo (primera inyección) después incompleto de Freund, por vía subcutánea. El intervalo entre cada inyección es de 3 a 4 semanas. Al final del protocolo de inmunización, las células de bazo de ratones se fusionan con un mieloma murino y se ponen en cultivo hasta aparición de los clones según el protocolo estándar^[9].

Los hibridomas que segregan los anticuerpos anti-NS1 se seleccionan por ELISA: la proteína recombinante NS1, obtenida según el ejemplo 1, se fija por adsorción sobre una placa de 96 pocillos a la concentración de 1 µg/ml en tampón Tris-maleato pH=6,2 durante una noche a 6°C. Después de 3 lavados con TBS-Tween 0,1% la proteína se incubaba con los sobrenadantes de los diferentes hibridomas diluidos al ½ en TBS-Tween 0,1%-gelatina 0,1% (TBS-TG) 1 hora a 37°C. Después de 3 nuevos lavados, se añade un conjugado anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante diluido en TBS-TG y se incubaba durante 45 minutos a 37°C antes de los primeros lavados, y después la revelación mediante el kit 1-step Turbo-TMB (Thermo-Scientific). Un sobrenadante de células 293T no transfectadas sirve de control de señal no específica. Las inmunoglobulinas de los clones positivos se purifican por inmunoadinidad sobre proteína A sefarosa 4FF (GE Healthcare) según el protocolo clásico. Se seleccionaron finalmente siete anticuerpos monoclonales en base a este protocolo: 10E2H2, 10G3G13, 13E1B3, 12D2D6, 9C9A9, 12H9G9 y 6H10B9.

Inmunizaciones de los conejos: El protocolo consistió en inyectar 3 conejos New Zealand White hembras, 5 dosis de 200 µg de proteína NS1 recombinante cada uno. La proteína NS1 se obtuvo como se describe en el ejemplo 1. Las tres primeras inyecciones eran intradérmicas, las dos siguientes subcutáneas. El adyuvante completo (primera inyección) y después incompleto de Freund se añadió a la proteína. Un plazo de 2 semanas se ha respetado entre cada inyección. Los conejos se desangran finalmente 82 días después de la primera inyección y se recuperan 60 ml de suero. El título de la presencia de los anticuerpos específicos se verifica según ELISA descrito en el ejemplo 2 (inmunización de ratones). Los sueros de los conejos extraídos antes de la inmunización sirven de control de especificidad. Las inmunoglobulinas G se purifican sobre columna de proteína A sefarosa. El título de estos anticuerpos purificados se ha estimado en ELISA mediante una dilución en serie del anticuerpo sobre la proteína recombinante NS1 recubierta en el fondo de los pocillos de una placa de 96 pocillos y después de la revelación por un anticuerpo anti-conejo acoplado con peroxidasa y diluido al 1/5000 con la ayuda del kit 1-step Turbo-TMB (Thermo-Scientific). El título, que corresponde a la más fuerte dilución para la cual la densidad óptica es tres veces superior al ruido de fondo obtenido con los sueros de los conejos pre-inmunes, se estima a 10⁵.

Ejemplo 3: caracterización de los anticuerpos monoclonales y policlonales

Material y método

Los anticuerpos se caracterizaron mediante diferentes enfoques: (i) transferencia western y ELISA sobre la proteína recombinante NS1 o sobre el material infectado por el virus del dengue; (ii) cartografía de epítomos (Spotscan y Phage Display).

(i) para la transferencia western, se utiliza una proteína NS1 recombinante desnaturalizada y reducida por la presencia de SDS y de β-mercapto-etanol en el tampón de carga, a una concentración final en proteína total de 0,1 mg/ml. El volumen de depósito es de 20 µl por pocillo, sobre un gel NuPAGE Novez Bis-Tris 4-12%, tampón de migración MOPS (Invitrogen). Después de la migración (bajo 200V, durante 1 hora) y de la transferencia sobre membrana de PVDF (bajo 400 mA, durante 45 min.), la calidad de la transferencia se aprecia mediante una coloración con amidoblack. Las membranas se saturan por el 5% de leche desnatada (Régilait) en una solución de TNT (Tris 15 mM, NaCl 0,14M, Tween 20 0,5% pH8) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la saturación, las membranas se incuban durante 1 hora con los diferentes anticuerpos a ensayar diluidos a 5 µg/ml en la solución de saturación. Después de aclarados con TNT, las membranas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con un conjugado anti-ratón fosfatasa alcalina diluido al 1:5000 (Jackson Immunoresearch) en la solución de saturación. Después del aclarado, la revelación se realiza con el kit 1-STEP NBT/BCIP (Thermo-scientific) según los datos de utilización recomendados.

NS1 se ha podido detectar en inmunoensayo de tipo sándwich. Para ello, las placas de 96 pocillos (Nunc) se recubrieron con los anticuerpos monoclonales anti-NS1 a ensayar en captura a 2 µg por pocillo. Después de 3 lavados en TBS-Tween 20 0,5% (TBS-T), las placas se saturan por el 10% de leche desnatada (Régilait) diluidas en TBS-T, durante 1h a 37°C. Se lava otra vez 3 veces en TBS-T, se deposita sobre las placas 100 µl de muestra a ensayar, eventualmente diluida en TBS-T 1% BSA y se incuba 2h a 37°C. Después de 3 lavados TBS-T, el anticuerpo policlonal de conejo anti-NS1 (descrito en el ejemplo 2) diluido al 1/2000 se añade y se incuba 2h a 37°C. Se efectúa otra vez 3 lavados en TBS-T, antes de añadir el conjugado acoplado con la peroxidasa de rábano picante (Jackson Immunoresearch) diluido al 1/5000 en TBS-T 3% BSA, 100 µl/pocillo. Después de 1h de incubación a 37°C y 3 lavados en TBS-T, se añade el sustrato 1-step Turbo-TMB (Thermo-Scientific), 100 µl/pocillo. Al final de 20 min, cuando el desarrollo de la coloración tiene lugar, se detiene la reacción mediante ácido sulfúrico 1N y se mide la absorbancia a 450 nm. Los resultados se obtuvieron en forma de valores brutos después de la sustracción del ruido de fondo

(ii) La técnica del Spotscan, adaptada según Frank y Döring ^[10], permite sintetizar de manera simultánea un gran número de péptidos fijados sobre una membrana de celulosa. Estos péptidos reproducen la secuencia del antígeno diana en forma de péptidos de 8 a 12 aminoácidos, que se solapan de 1 a 4 residuos. Estos péptidos se ponen después en contacto con el anticuerpo a estudiar en un ensayo colorimétrico de tipo transferencia, y la identificación de los péptidos inmunorreactivos permite deducir la secuencia mínima del epítipo del anticuerpo y localizarlo precisamente sobre el antígeno.

La síntesis se efectúa sobre una membrana de celulosa que lleva uniformemente unas ramas de polietilenglicol (PEG) de una longitud de 8 a 10 unidades, que presentan una función NH₂ libre al final de la cadena. Se desarrolla del extremo C-terminal hacia el extremo N-terminal de los péptidos. Los aminoácidos tienen su función aminada protegida por un grupo Fmoc (9-fluoremetiloxicarbonilo), y sus cadenas laterales, susceptibles de reaccionar durante la síntesis, están también protegidas por unos grupos tritilo, t-butilo o t-butil-éter. Las soluciones madres de aminoácidos se preparan a una concentración de 0,33 M en NMP (N-metil-pirrolidona) que contiene 0,5 M de HOBT (hidroxibenzotriazol). El depósito de los aminoácidos se efectúa con la ayuda del robot ASP 222 (Abimed, Langenfeld, Alemania), controlado por medio del programa AutoSpot XL. La utilización de este robot permite realizar simultáneamente hasta 4 membranas de 96 puntos, es decir 384 péptidos.

Para un ciclo de acoplamiento de un aminoácido, el robot deposita 0,7 µl de la solución de aminoácido activado extemporáneamente (un volumen de solución de diisopropil-carbodiimida 1,1 M diluido en NMP para 3 volúmenes de solución madre de aminoácido) sobre las membranas. Este depósito se repite una segunda vez, después las membranas se aclaran en DMF (N,N-dimetilformamida). Los grupos NH₂ que no han reaccionado se acetilan después mediante 4 a 6 incubaciones de 10 minutos en una solución de anhídrido acético al 10% en DMF, a fin de evitar la aparición de péptidos abortivos o truncados. Después de 3 lavados de 2 minutos en DMF, los grupos Fmoc que protegen la función aminada de los aminoácidos se escinden mediante una incubación de 5 minutos en una solución de piperidina al 20% en DMF. Después de 4 lavados en DMF, los puntos se colorean con la ayuda de una solución de azul de bromofenol al 1% en DMF, después la membrana se aclara 3 veces en metanol y se seca al aire libre antes del ciclo de acoplamiento siguiente.

Este protocolo se repite para la adición de cada nuevo aminoácido. Después del acoplamiento del último aminoácido, los péptidos se acetilan a fin de permitir el bloqueo de todos los grupos NH₂ libres, impidiendo así la adición de otro aminoácido. Después, las cadenas laterales de todos los péptidos se desprotegen por la incubación de las membranas en un baño de ácido trifluoroacético/diclorometano/triisobutilsilano (5:5:0,3) durante 1 hora. Las membranas se aclaran después 4 veces en diclorometano, 3 veces en DMF y 3 veces en metanol antes de secarse al aire libre y conservarse a -20°C hasta la inmunorrevelación.

Para inmunorrevelar los puntos con un anticuerpo monoclonal, las membranas se aclaran en primer lugar en metanol, después se lavan en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 140 mM, KCl 3 mM) antes de incubarse durante la noche a temperatura ambiente en la solución de saturación (solución concentrada 10X a base de caseína (Western Blocking reagent, Roche) diluida en TBS-Tween 20 0,05% (TBS-T) y que contiene un 5% de sacarosa). Después de un lavado de 10 minutos en TBS-T, las membranas se incuban durante 1h30 a 37°C con el anticuerpo monoclonal diluido a 20 µg/ml en solución de saturación. Las membranas se lavan después 3 veces en TBS-T, después se incuban con el conjugado anti-ratón acoplado con fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch), diluida al 1/2000 en solución de saturación. Después de 2 lavados de 10 minutos en TBS-T, y después de 2 lavados en CBS (ácido cítrico 10 mM pH 7, NaCl 140 mM, KCl 3 mM), el revelador, preparado extemporáneamente (5-bromo, 4-cloro, 3-indoilo, fosfato 600 µM, bromuro de tetrazolio tiazolil blue 720 µM, y MgCl₂ 5 mM en CBS), se pone en contacto con la membrana durante 30 a 45 minutos en la oscuridad. Los péptidos inmunorreactivos aparecen en azul-violeta. Después de 3 aclarados en agua destilada, las membranas se escanean y después se conservan en agua hasta la regeneración.

La regeneración permite eliminar los anticuerpos y los conjugados fijados sobre los péptidos, lo que permite así realizar un nuevo ensayo de inmunoreactividad frente a otro anticuerpo. Las membranas sufren una serie de lavados de 10 minutos cada una: 1 lavado en agua destilada, 6 lavados en DMF, 3 lavados en tampón de

ES 2 701 033 T3

regeneración A (urea 8 M, SDS (sulfato de dodecilsodio) 35 mM, β -mercaptoetanol 0,1 %), 3 lavados en tampón de regeneración B (agua destilada/etanol/ácido acético 4:5:1), después 2 lavados en metanol. Las membranas se secan después al aire libre antes de almacenarse a -20°C.

- 5 La caracterización de los epítomos por cribado de bancos de péptidos portados por fagos se ha realizado utilizando el kit comercial PhD12 Phage Display Peptide Library Kit (Cat. No. E#8110S) de New England Biolabs, siguiendo las instrucciones proporcionadas con el kit, versión 2.7 del protocolo que da de noviembre de 2007.

Resultados:

10

Tabla 1

Anticuerpos de revelación	Formas reconocidas de la NS1 recombinante
Anti-tag His (Qiagen)	Monómero + Dímero
Mab 10E2H2	Dímero
Mab 10G3G12	Dímero
Mab 13E1B3	Monómero + Dímero
Mab 12D2D6	Dímero
Mab 9C9A9	Dímero
Mab 12H9G9	Monómero + Dímero
Mab 6H10B9	Monómero + Dímero
Policlonal	Monómero + Dímero
Mab: anticuerpos monoclonal	

15

La tabla 1 resume las formas monoméricas/oligoméricas reconocidas por los anticuerpos monoclonales y el anticuerpo policlonal en transferencia Western. Todos los anticuerpos detectan la forma dimérica pero la forma monomérica se detecta únicamente por los anticuerpos monoclonales 13E1B3, 12H9G9, 6H10B9 y el policlonal de conejo. El anticuerpo anti-tag histidina reconoce las formas monoméricas y diméricas. La forma monomérica está presente por que las muestras se han desnaturizado previamente. La forma hexamérica no se reconoce jamás, ya que es muy inestable^[5].

20

Tabla 2

	NS1 recomb.	Células Vero infectadas por DV	
		lisados	sobrenadantes
10E2H2	++	DV1-DV2-DV3	X
10G3G13	+	DV1-DV2-DV3	DV3
13E1B3	+++	DV1-DV3	DV1-DV3
12D2D6	+	DV1-DV2-DV3	X
9C9A9	++	DV1-DV2-DV3	DV3
12H9G9	+++	DV1-DV3	DV1-DV3
6H10B9	+	DV1-DV2-DV3	X
PA	+++	NA	NA
Platelia™	+++	DV1-DV2-DV3-DV4	DV1-DV2-DV3-DV4

25

La tabla 2 recapitula los diferentes ELISA llevados a cabo sobre NS1 recombinante o sobre el material procedente de las células Vero infectadas por uno de los cuatro serotipos del virus del dengue (DV1, DV2, DV3 o DV4). El anticuerpo policlonal (PA) obtenido después de la inmunización de conejos por la proteína NS1, así como el kit Platelia comercializado por BioRad (Platelia™) también se ensayaron, a título comparativo. DVx (en el que x=1, 2, 3, 4) indica que la señal se considera como positiva para el serotipo x con una densidad óptica a 450 nm superior a 0,1. La intensidad de la señal se considera como ligera (+) cuando está comprendida entre 0,1 y 0,4 de densidad óptica a 450nm; se considera como media (++) entre 0,4 y 0,9 de densidad óptica y fuerte (+++) para una densidad óptica leída superior a 0,9. Las mejores señales obtenidas sobre la proteína recombinante se han obtenido con los anticuerpos monoclonales 13E1B3 y 12H9G9 y el anticuerpo policlonal de conejo. Sólo los anticuerpos monoclonales 10G3G13, 13E1B3, 9C9A9 y 12H9G9 pueden detectar NS1 madura, segregada en el sobrenadante de cultivo por unas células Vero infectadas por el virus del dengue. La especificidad está restringida a los serotipos 1 y 3 para los monoclonales 13E1B3 y 12H9G9. Está restringida al serotipo 3 para 10G3G13 y 9C9A9.

35

Mapeo epitópico:

40

El mapeo epitópico ha dado resultados explotables sólo para los anticuerpos monoclonales 13E1B3, 12H9G9, 10G3G12 y 9C9A9. Todos los anticuerpos salvo 12H9G9 (que se ha mapeado mediante la técnica de *Phage display*) han sido mapeado por la técnica SpotsScan. Los resultados obtenidos son ilustrados mediante la figura figure 1. Para 13E1B3, 12H9G9, los epítomos son discontinuos. 10G3G12 y 9C9A9 tienen el mismo epítomo lineal. Todos los epítomos caracterizados se concentran en un péptido de 20 aminoácidos localizado en la mitad C-terminal de la

proteína NS1. Este péptido corresponde a una secuencia bastante bien conservada. Algunos aminoácidos de este péptido son no obstante serotipo-dependiente, en particular aquellos situados aguas abajo de la glicina 13 (véase la numeración de la figura 1) y pueden explicar la restricción de 13E1B3 y 12H9G9 al reconocimiento de los serotipos 1 y 3. De manera interesante, esta región de NS1 ya se ha identificado como inmunodominante para el virus del dengue de serotipo 2^[11].

Para los experimentos de detección en SELDI-TOF MS, se seleccionaron unos anticuerpos monoclonales que podrían reconocer al menos la forma monomérica de la proteína recombinante NS1 con además un buen nivel de reconocimiento en ELISA. Estos anticuerpos debían reconocer también las formas maduras de la proteína NS1 que estaban segregadas en un sistema de infección *in vitro* de células Vero por el virus del dengue. Los anticuerpos 13E1B3 y 12H9G9 corresponden a estos criterios. Detectan las formas maduras de la NS1 de los virus del dengue de los serotipos 1 y 3. Las formas maduras corresponden a las formas excretadas por las células en el sobrenadante de cultivo, están desprovistas de péptido señal, glicosiladas y multiméricas, es decir al menos diméricas.

Ejemplo 4: comparación ELISA de captura y SELDI-TOF sobre material infectado *in vitro*

Material y métodos:

Unas células Vero (ATCC IDCCL81) cultivadas en DMEM complementadas por el 10% de suero fetal de ternera (DMEM-SVF) se infectan en la fase de la sub-confluencia (90% de confluencia). Después del contacto de 90 minutos de las células con unas de las cepas virales (DV1, DV2, DV3, DV4; Sanofi-Pasteur) diluida en 1 ml de DMEM sin suero a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1, el inóculo se sustituye por 10 ml de medio DMEM-SVF. Se recoge un alícuota del sobrenadante de cultivo a diferentes tiempos de incubación post-infección (90 minutos, 6, 12, 24 y 36 horas, 5 y 7 días). Las células muertas se eliminan por una centrifugación de 5000 g/5 minutos. El lisado celular se obtiene después de los mismos tiempos de incubación con el virus. En este caso, se añade 1 ml de tampón de lisis (TBS-NP401%) sobre la alfombra celular y se deja actuar 15 minutos a 4°C. Los restos se eliminan por una centrifugación de 10 000g/5 minutos. La infección se controla mediante la utilización de ELISA Platelia™ (BioRad) que detecta la presencia de la proteína NS1 en el sobrenadante de cultivo.

Los ELISA de captura se efectúan como se describe en el ejemplo 3, utilizando en captura los anticuerpos obtenidos por inmunizaciones de ratones (véase el ejemplo 2).

Se ha utilizado la tecnología SELDI-TOF MS para el análisis en espectrometría de masa de mezcla de proteínas retenidas específicamente por unas superficies cromatográficas. Aquí, la superficie cromatográfica se acopla con un anticuerpo anti-NS1 seleccionado sobre su aptitud para reconocer la NS1 recombinante y la NS1 sintetizada *in vitro* después de la infección de las células Vero. Los anticuerpos se acoplan sobre una tira pre-activada de tipo PS20 (grupo epoxi) por incubación de 0,6 µg de anticuerpos durante 1 hora a temperatura ambiente. Las tiras se saturan después 5 minutos con PBS-TritonX100 0.5% y se lavan una vez con PBS. Las muestras (50 µl), diluidas 1 vez con PBS se depositan sobre las tiras saturadas e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente en un bioprocesador adaptado. Finalmente, se lavan 3 veces con PBS-TritonX100 0,05%, después 2 veces con PBS, a fin de eliminar el detergente. Una matriz SPA-TFA0,5%, realizada de manera extemporánea se añade entonces antes de la lectura sobre el aparato según las instrucciones del fabricante (CIPHERGEN Protein Biology System II (nombre comercial), Biorad). Los espectros se calibran mediante un patrón interno (ProteinChip All-in-one standard II (nombre comercial), Biorad) y se analizan por la utilización de un programa apropiado (ProteinChip Software V3 (nombre comercial), Biorad). Todas las muestras se analizaron dos veces de manera independiente. Los consumibles asociados a esta tecnología se comercializan por BioRad. Las muestras analizadas de manera comparativa por las dos tecnologías son las siguientes:

Unos lisados y unos sobrenadantes de cultivo extraídos a 90 minutos; 6, 12, 24, 48 horas; 5, 7 días post-infección;

Proteína recombinante NS1 (50 ng) diluida en plasma sano (es decir procedente de un paciente que no tiene dengue);

Unos lisados y unos sobrenadantes de cultivo de células Vero no infectados (7 días post-infección);

Un medio de cultivo.

Para el SELDI-TOF, el valor asociado a los picos corresponde a la masa reportada a la carga (m/z) después de la calibración con un estándar interno. Los ELISA de captura de la NS1 son ilustrados mediante histogramas efectuados sobre las mismas muestras. Los valores corresponden a la densidad óptica leída a 450nm (media de 2 pocillos para 2 experimentos independientes).

Resultados

Los resultados obtenidos sobre el material infectado por el virus de serotipo 3 con el anticuerpo 13E1B3 se presentan en la figura 2. El mismo experimento, pero llevado a cabo con el anticuerpo 12H9G9, da unos resultados

comparables. En los lisados de células infectadas se anota, 12 horas después de la infección, la aparición de un pico de aproximadamente 43.500 Daltons (Da) presente en las extracciones ulteriores. Este pico está ausente en los lisados de las células no infectadas. En los sobrenadantes de cultivo, un pico de aproximadamente 45,500 Da aparece sin ambigüedad 24 horas después de la infección. Este pico está ausente en los sobrenadantes de cultivo de células no infectadas. Aparece a veces una ligera señal 90 minutos y 6 horas después de la infección: probablemente se deba a pequeñas cantidades de proteína NS1 aportadas por inoculación viral durante la infección, que desaparecen después por degradación (12 horas después de la infección). La diferencia de masa molecular observada entre las proteínas NS1 del lisado y del sobrenadante probablemente se deba a modificaciones post-traduccionales asociadas a la excreción de proteínas (por ejemplo, glicación tardía de Golgi). La proteína recombinante NS1 se detecta en una masa molecular cercana. Se obtuvieron resultados similares con células Vero infectadas con el virus del dengue serotipo 1. No se detecta ninguna señal en el material infectado por los serotipos 2 o 4, lo que es coherente con la naturaleza del inmunógeno utilizado que estaba cerca de los serotipos 1 y 3.

Un ELISA de captura utilizado en las mismas muestras confirma estos resultados. La proteína NS1 está presente en los lisados y sobrenadantes después de la infección. Se detecta en los lisados de las células infectadas antes de detectarse en los sobrenadantes de cultivo (6 horas frente a 12 horas). Como se desprende de la figura 2, las especificidades obtenidas utilizando un ELISA o SELDI TOF MS son comparables. Sin embargo, bajo las condiciones del ensayo, utilizando los anticuerpos monoclonales 13E1B3 y 12H9G9 como anticuerpos de captura, los serotipos 2 y 4 no se detectan en SELDI TOF MS, lo que indica que SELDI TOF MS es un método específico de los serotipos en función del anticuerpo utilizado en la captura.

Ejemplo 5: Comparación ELISA y SELDI-TOF sobre muestras humanas seriadas

Material y métodos:

Las técnicas ELISA de captura y SELDI-TOF MS elaboradas y descritas en los ejemplos 3 y 5 se utilizan para evaluar de manera comparativa la presencia de NS1 en los plasmas de un paciente infectado por el virus del dengue de serotipo 3 (DV3) y extraído 2, 3, 4, 5 días después del inicio de los síntomas. Estas muestras provienen de un estudio retrospectivo llevado a cabo inicialmente por el instituto Louis Malardé de Papeete (Tahití). Este estudio se ha revisado y aprobado por el comité ético local. Las muestras eran las siguientes:

Unos sobrenadantes y unos lisados de cultivo de células Vero infectadas por el virus del dengue de serotipo 3 (2 días post-infección);

Unos sobrenadantes y unos lisados de cultivo de células Vero no infectadas;

Proteína recombinante NS1 (50 ng) diluida en plasma sano (es decir procedente de un paciente que no tiene dengue);

Plasma sano (es decir procedente de un paciente que no tiene dengue);

Muestras seriadas de plasmas (infección por el virus del dengue de serotipo 3) a 2, 3, 4, 5 días después de la aparición de los síntomas.

El valor asociado a los picos corresponde a la masa reportada a la carga (m/z) después de la calibración con un estándar interno. Los histogramas ilustran ELISA de captura de NS1 efectuados sobre las mismas muestras. Los valores corresponden a la densidad óptica leída a 450nm (media de 2 pocillos para 2 experimentos independientes).

Resultados:

Los resultados obtenidos con el anticuerpo 13E1B3, se presentan en la figura 3. El mismo experimento, pero llevado a cabo con el anticuerpo 12H9G9 da unos resultados comparables. Una señal está presente en los plasmas "serotipo 3" a partir de dos días después del inicio de los síntomas. Esta señal tiene una masa molecular de aproximadamente 45 000 Da, comparable con aquella obtenida con una NS1 recombinante en solución (1 ng/ul) o sobre unas muestras procedentes de una infección de células Vero *in vitro*. No hay ninguna señal sobre los plasmas sanos así como sobre el material no infectado por el virus del dengue. De la misma manera, se ha podido detectar una señal sobre dos plasmas de serotipo 1 (4 y 5 días después del inicio de los síntomas) pero no sobre dos plasmas de serotipo 2 (4 días después del inicio de los síntomas). Los resultados obtenidos en SELDI-TOF MS se confirmaron por ELISA de captura. El SELDI-TOF MS permite por lo tanto la detección de la NS1 en un medio biológico complejo con la ayuda de un único anticuerpo monoclonal específico con una buena especificidad. La sensibilidad es próxima, aunque ligeramente inferior, a la de un ELISA clásico. La técnica permite también detectar pequeñas modificaciones de la proteína (por ejemplo glicosilaciones) y detectar, en función del anticuerpo elegido, los diferentes serotipos del virus a partir de la NS1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SB Halstead. *The lancet* 2007; 370: 1644-52
2. AS Leong *et al.* *Semin.Diagn.Pathol.* 2007; 24(4):227-236
- 5 3. K. Clyde *et al.* *J. Virol.* 2006; 23: 11418-11431
4. G.W Smith, *J.Gen.Virol*, 66, 559-571
- 10 5. P. Avirutnan *et al.*, *JID* 2006; 193: 1078-108 G.W Smith^[4] (*J.Gen.Virol*, 66, 559-571)
6. Flamand *et al.* *J.Virol*, 73(7) : 6104-6110
7. Hutchens *et al.* (*Adv Exp Med Biol.* 1998;443:23-3
- 15 8. Ashock MS *et al.* *Vaccine*, 2002
9. G. Köhler y C. Milstein, 1976, *Eur J Immunol*, 6, 511-519
- 20 10. R. Frank y R. Döhning, 1988, *Tetrahedron*, 44, 6031-6040
11. Vaughan *et al.*, *Viral Immunol.*, 23(3), 259-284

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para poner en evidencia *in vitro* una infección por un virus del dengue en un individuo que comprende las etapas de:
- 5 poner en contacto una muestra sanguínea del individuo con un ligando específico de la proteína NS1 de dicho virus del dengue para capturar la proteína NS1, si está presente en la muestra sanguínea, inmovilizándose dicho ligando sobre un soporte sólido,
- 10 poner en evidencia la presencia de la proteína NS1 mediante una lectura por espectrometría de masa, y si la proteína NS1 se pone en evidencia, concluir que el individuo se ha infectado por el virus del dengue.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ligando específico de la proteína NS1 se selecciona entre los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y las proteínas de afinidad a las propiedades competitivas.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el ligando es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el ligando es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal altamente purificado por afinidad frente a la proteína NS1.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ligando es específico de la proteína NS1 del virus del dengue de al menos un serotipo.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ligando es específico de la proteína NS1 del virus del dengue de dos serotipos.
7. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el ligando es un anticuerpo monoclonal específico de la forma monomérica, de la forma dimérica y de la forma hexamérica de la proteína NS1.
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el soporte sólido se selecciona entre una tira, una placa, una bola, un chip y una fase cromatográfica.

ES 2 701 033 T3

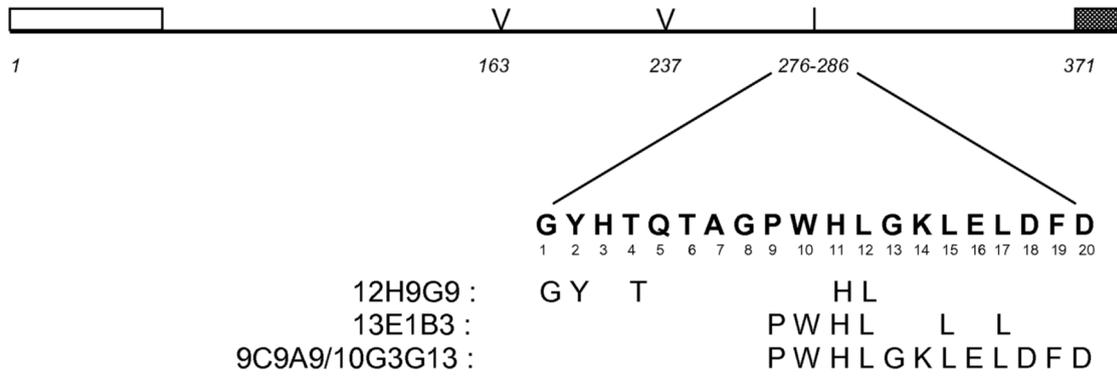


Figura 1

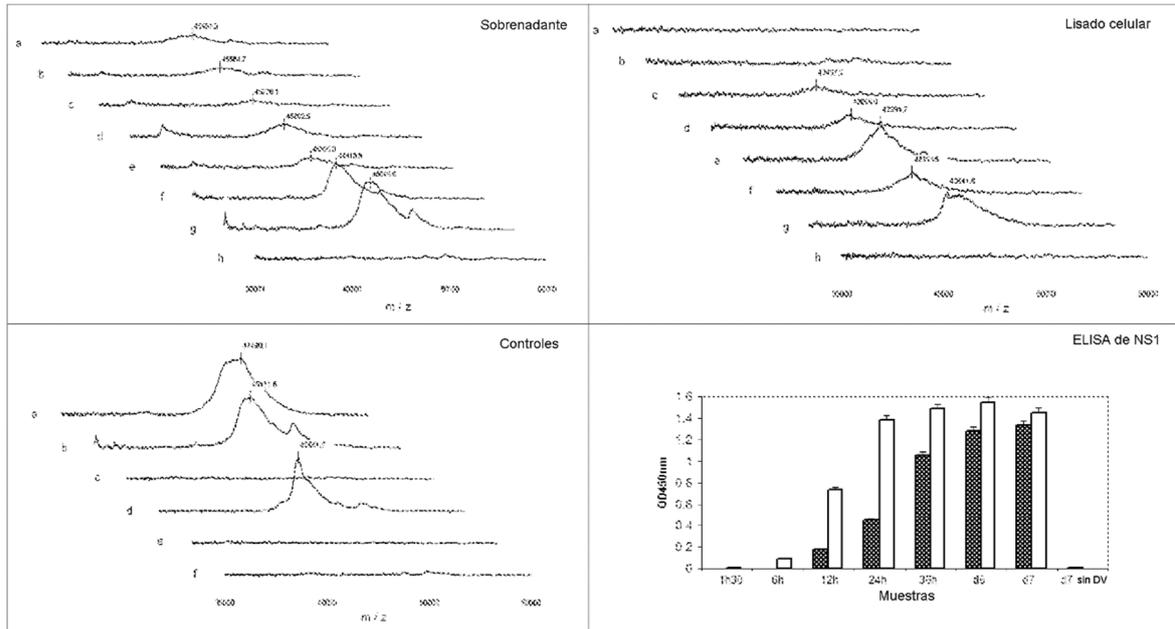


Figura 2

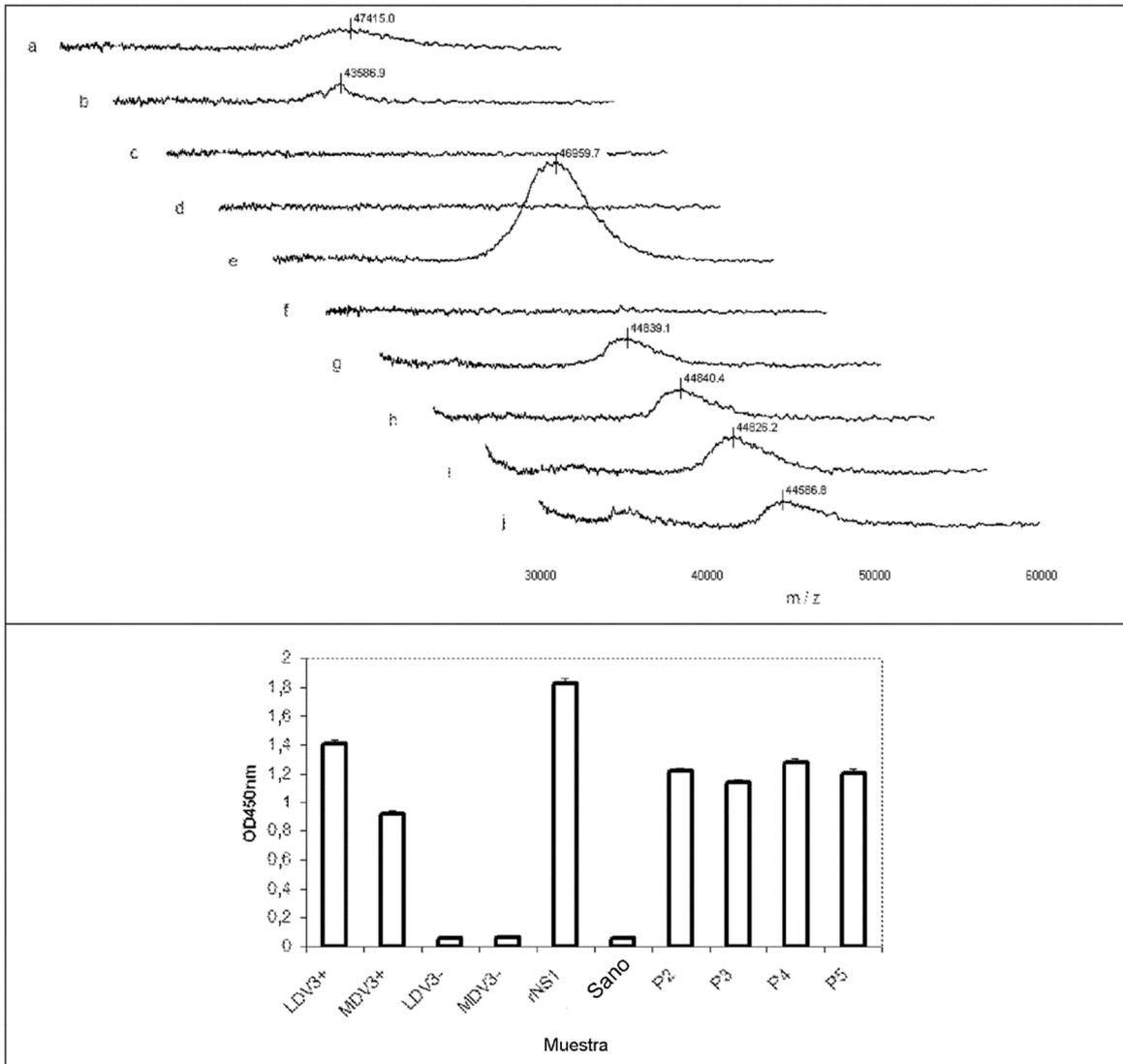


Figura 3