

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 497**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2017 PCT/EP2017/063446**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017 WO17211713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2017 E 17727873 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3465206**

54 Título: **Procedimiento para la detección de un anticuerpo IgM específico para un flavivirus en una muestra**

30 Prioridad:

**06.06.2016 EP 16173043**

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

**21.07.2020**

73 Titular/es:

**MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN (100.0%)  
Spitalgasse 23  
1090 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**HEINZ, FRANZ X. y  
STIASNY, KARIN**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 774 497 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 de un anticuerpo IgM específico para un flavivirus en una muestra

La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de un anticuerpo IgM específico para un flavivirus en una muestra.

5 Las infecciones por flavivirus son de importancia mundial para la salud humana y significan, como lo ilustra la propagación de los virus Zika, dengue y el virus del Nilo Occidental, una amenaza creciente. El diagnóstico serológico de las infecciones recientes por flavivirus requiere inmunoensayos que detectan anticuerpos IgM específicos con alta sensibilidad. Para este propósito, se usan varios formatos de ensayo que están diseñados de diferentes maneras, por ejemplo: a) ELISA indirectos en los que el antígeno de flavivirus directamente unido a una fase sólida (por ejemplo, una placa de microtitulación) es incubado con el suero del paciente y en los que los anticuerpos IgM unidos al antígeno inmovilizado son detectados usando un anticuerpo contra la IgM humana; b) ELISA de captura de anticuerpos M (MAC) en el que la fase sólida está revestida con un anticuerpo contra la IgM humana y es incubada con el suero del paciente y en el que la detección de la IgM específica se realiza usando el antígeno de flavivirus respectivo (documento WO 2011/004324 A1, WO 2016/022071 A1).

15 Un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG después de las inmunizaciones para flavivirus describe, por ejemplo, en el documento WO 99/06068 A2. El ensayo allí descrito usa la forma dimerica truncada de la proteína de envoltura del dengue como antígeno inmovilizado para la detección de anticuerpos IgG contra flavivirus.

La ventaja del ELISA de MAC en comparación con el ELISA indirecto es la minimización de una posible interferencia con factores reumatoides y otras reacciones no específicas, así como la capacidad de intercambio de antígenos dentro del mismo formato de prueba.

20 Esto fue resaltado por Van Loon et al. (J. Clin. Microbiol. 13(1981): 416-422) y Van Loon et al. (J. Clin. Microbiol. 17(1983): 997-1004) en los que el desempeño de los ELISA de MAC directos para el diagnóstico de infecciones por toxoplasma o citomegalovirus, respectivamente, se comparó con los ELISA indirectos. Tal comparación también se desveló en Heinz et al. (J. Clin. Microbiol. 14 (1981): 141-146), quienes confirmaron que el ELISA de MAC para la detección de anticuerpos IgM contra el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas en suero y líquido cefalorraquídeo es más sensible que un ELISA indirecto.

Por lo tanto, este formato de prueba se ha convertido en el procedimiento estándar para el serodiagnóstico de las infecciones por dengue (Shamala 2015) y es recomendado por la OMS como un requisito mínimo para los laboratorios de diagnóstico (Ref: OMS 2009). El componente más crítico para la calidad del ELISA de MAC es el antígeno y el procedimiento de su detección.

Los sistemas de prueba para la detección de infección por flavivirus en pacientes humanos se desvelan adicionalmente en Revetz et al. (Clin. Biochem. 42 (2009), 180-184), los documentos WO 99/09414 A1, WO 2008/152528 A2 y EP 2980099 A1.

35 La diana principal de los anticuerpos neutralizantes de flavivirus es la proteína E de la envoltura de flavivirus, que se compone de tres dominios (D1, DII, DIII). Se ha descubierto que la actividad neutralizante del flavivirus es impulsada principalmente por anticuerpos dirigidos a los dominios DI y DII de la proteína E o a la estructura del dímero E (Jarmer et al., J. Virol. 88 (2014): 13845-13857) Otro estudio asignó la actividad neutralizante del flavivirus tras la vacunación contra la fiebre amarilla (FA) a anticuerpos dirigidos a epítopos cuaternarios complejos de la proteína E exhibidos en la superficie del virión. (Vratskikh et al., Plos Pathogens 9 (2013): e1003458).

40 Vogt et al. (J. Virol. 83(2009): 6494-6507) caracterizaron dos anticuerpos monoclonales humanos específicos del virus del Nilo Occidental (VNO) y desvelaron que su actividad neutralizante podría verse alterada por mutaciones en la interfaz del dímero en DII de la proteína E, así como en la bisagra entre DI y DII.

Como consecuencia, se han desarrollado diversas composiciones inmunes compuestas de diferentes formas recombinantes de la proteína E para la vacunación contra flavivirus (por ejemplo, documentos WO 2004/052293 A2, WO 2006/115548 A2, WO 2016/012800 A1).

Si bien estos estudios son importantes para definir las respuestas de IgG humana a la proteína E del flavivirus, no están relacionados con el diagnóstico serológico de las infecciones por flavivirus mediante la detección de anticuerpos IgM que se producen temprano en la infección.

50 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento ventajoso para la detección de IgM específicas contra flavivirus en muestras de pacientes, especialmente para proporcionar ELISA de MAC mejorados para la detección de anticuerpos IgM específicos contra flavivirus para la detección de infecciones recientes por flavivirus.

Por lo tanto, la presente invención desvela un procedimiento para la detección de un anticuerpo IgM específico para un flavivirus en una muestra, comprendiendo las etapas de

- (a) poner en contacto la muestra con un soporte sólido que comprende moléculas de unión a IgM inmovilizadas,
- (b) permitir la unión de anticuerpos IgM en la muestra a las moléculas de unión de IgM en el soporte sólido de modo que los anticuerpos IgM también se inmovilicen en el soporte sólido y
- (c) detectar anticuerpos IgM específicos para un flavivirus permitiendo la unión de un complejo comprendiendo
  - 5 (i) un dímero antiparalelo de la proteína E soluble (sE) de flavivirus y
  - (ii) un marcador

e identificar la unión del complejo al anticuerpo IgM específico para el flavivirus mediante la detección del marcador.

La presente invención proporciona un procedimiento para la detección de un anticuerpo IgM específico para un flavivirus en una muestra, comprendiendo las etapas de

- 10 (a) poner en contacto la muestra con un soporte sólido comprendiendo moléculas de unión a IgM inmovilizadas,
- (b) permitir la unión de anticuerpos IgM en la muestra a las moléculas de unión de IgM en el soporte sólido de modo que los anticuerpos IgM también se inmovilicen en el soporte sólido, y
- (c) premezclar un dímero antiparalelo de la proteína E soluble (sE) de flavivirus con un marcador para la
  - 15 formación de un complejo comprendiendo el dímero sE y el marcador, en el que el dímero antiparalelo de sE comprende una etiqueta y en el que la etiqueta une el marcador al dímero antiparalelo de sE, y
- (d) detectar los anticuerpos IgM específicos para un flavivirus permitiendo la unión del complejo preformado

e identificar la unión del complejo al anticuerpo IgM específico para el flavivirus mediante la detección del marcador.

20 Por lo tanto, la presente invención proporciona un nuevo sistema de detección específicamente adecuado para el formato de prueba ELISA de MAC. Los antígenos usados hasta la fecha en los ELISA de MAC de flavivirus incluyen preparaciones de virus o partículas similares a virus producidas de forma recombinante que se detectan en una etapa posterior mediante un anticuerpo específico de virus mediante una reacción enzimática. Por un lado, la producción de preparaciones de virus requiere la manipulación de agentes altamente infecciosos, en muchos casos de nivel de bioseguridad 3, y su inactivación para aplicaciones comerciales; las partículas similares a virus, por otro lado, son relativamente costosas, difíciles de purificar, producir y estandarizar.

25 El formato ELISA de MAC es el formato específicamente preferente del procedimiento y el sistema de prueba de acuerdo con la presente invención. La prueba de IgM es de importancia general para el diagnóstico de infecciones por flavivirus porque la detección directa del virus (por ejemplo, mediante PCR) solo es posible en un período de tiempo limitado después de una infección, y en muchos casos ya es negativa a pesar de la presencia de síntomas clínicos. En el contexto de la medicina de viaje, el virus rara vez será detectable al regresar de un viaje a regiones endémicas de flavivirus. En consecuencia, la serología, en particular la detección de IgM, es muy importante para el diagnóstico del flavivirus.

30 Entre los flavivirus patógenos humanos más importantes se encuentran los virus dengue (serotipos 1 a 4) y el virus Zika de rápida propagación, que circulan simultáneamente en las regiones tropicales y subtropicales. Dado que estas regiones también son destinos turísticos populares, las pruebas confiables para diferenciar estas infecciones no solo son de gran importancia en las áreas endémicas, sino también en los países de origen de los viajeros.

35 En comparación con los formatos ELISA de MAC existentes para detectar IgM de flavivirus, el sistema de prueba de diagnóstico de acuerdo con la presente invención tiene varias ventajas: el ensayo de acuerdo con la invención tiene una excelente idoneidad para la detección altamente específica de anticuerpos IgM contra flavivirus, en particular el virus dengue, el virus Zika, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG). Los datos obtenidos en el transcurso de la presente invención también muestran que esta prueba no solo puede distinguir perfectamente entre infecciones con virus Zika y dengue, sino que también es adecuada para el diagnóstico específico de serotipo de infecciones por virus dengue (serotipo 1 a 4). Además, el procedimiento de acuerdo con la presente invención también permite la detección de infecciones dobles, por ejemplo, con virus dengue y Zika.

45 Además, debido a la estabilidad del presente sistema de prueba y a la provisión confiable de sus componentes (especialmente el complejo comprendiendo el dímero sE y el marcador), el sistema de prueba de acuerdo con la presente invención puede estandarizarse de manera eficaz y confiable. En particular, el antígeno específico del virus (proteína E soluble) se puede producir de forma recombinante en grandes cantidades y en forma altamente purificada. Para la producción de sE, es adecuado cualquier sistema recombinante que permita el plegamiento nativo de sE (por ejemplo, en células HEK, células CHO, células 293, células de *Drosophila* o sistemas de expresión basados en baculovirus). También los otros componentes se pueden adquirir comercialmente.

50 En contraste con esto, los sistemas de prueba comparables actualmente en el mercado usan virus inactivados, lisados de células infectadas o partículas similares a virus producidas de forma recombinante. La principal desventaja de los

virus inactivados o los lisados de células es que requieren la manipulación de virus que son altamente patógenos para los seres humanos. Las principales desventajas de las partículas similares a virus (VLP, RSP, antígeno recombinante prM-E) son (1) la inexistencia de un enfoque relativamente simple para la purificación del antígeno (aunque es posible la producción recombinante); sin embargo, estos antígenos se usan como un sobrenadante de cultivo celular no purificado, lo que tiene la desventaja de que se requiere un reactivo adicional y una etapa de prueba adicional (a saber, un anticuerpo específico de virus y un reactivo de detección de anticuerpos correspondiente) y de que para cada prueba de virus (dengue, Zika, TBE, etc.), se necesita un anticuerpo específico; (2) el hecho de que las partículas similares a virus contienen una membrana lipídica y, por lo tanto, son inherentemente propensas a la inestabilidad y, por lo tanto, a problemas de almacenamiento (en contraste con los antígenos solubles extremadamente estables en el ensayo de acuerdo con la invención); (3) que las partículas, mediante las que las proteínas E están ancladas en la membrana lipídica, son sensibles al pH; de hecho, a valores de pH ácidos, las proteínas E en la superficie de la partícula se pliegan a una forma completamente diferente, lo que conduce a la agregación de las partículas; en consecuencia, las formas particuladas de antígenos, tal como VLP, son antígenos diagnósticos muy sensibles.

Los hallazgos de que las poblaciones de anticuerpos en sueros de pacientes infectados por o vacunados contra flavivirus consisten principalmente en anticuerpos IgG dirigidos a epítopos complejos de los dominios DI y/o DII de la proteína E del flavivirus (Jarmer et al., *J. Virol.* 88 (2014): 13845-13857; Vratskikh et al., *Plos Pathogens* 9 (2013): e1003458; Vogt et al. *J. Virol.* 83(2009): 6494-6507) sienta las bases para el desarrollo de mejores protocolos de inmunización y ensayos de detección de anticuerpos. Como tal, el documento WO 99/06068 A2 describe un proceso de inmunización de ratones con proteínas E diméricas truncadas recombinantes y de análisis de los sueros diez días después de la última inyección, demostrando la presencia de anticuerpos IgG usando proteínas E diméricas truncadas recombinantes como antígenos en un ELISA indirecto, así como anticuerpos neutralizantes (PRNT). Por el contrario, el sistema de prueba de la presente proporciona un complejo de marcador-dímero sE preformado en un sistema ELISA de MAC para el diagnóstico de infecciones agudas por flavivirus. Las ventajas del ensayo de la invención se manifiestan en la detección altamente específica de anticuerpos IgM contra flavivirus en sueros humanos para el diagnóstico diferencial simultáneo de diversas infecciones por flavivirus. Si bien se esperaba de la técnica anterior (Van Loon et al. *J. Clin. Microbiol.* 13(1981): 416-422; Van Loon et al. *J. Clin. Microbiol.* 17(1983): 997-1004 y Heinz et al. *J. Clin. Microbiol.* 14 (1981): 141-146) que un ensayo ELISA de MAC pudieran ser más sensible que un ELISA indirecto, el efecto técnico observado debido al uso de un complejo de marcador-dímero sE preformado de acuerdo con la presente invención, en lugar de solo sE, fue inesperado y proporciona una prueba más rápida y más confiable en pacientes con sospecha de infección por flavivirus (Fig. 3 y 9).

Por lo tanto, la presente invención desvela un nuevo sistema de detección, comprendiendo los siguientes componentes: una proteína E de flavivirus soluble recombinante (sE; el componente principal de la superficie del flavivirus; véase la Figura 1A) proporcionada como un dímero antiparalelo (Figura 1B). Es importante para el ensayo de la presente invención proporcionar la proteína E como dímero antiparalelo de sE y no en otra forma (como formas monoméricas de sE o en una forma inmadura o madura natural (por ejemplo, en partículas virales completas o VLP)). El dímero antiparalelo sE comprende una etiqueta (preferentemente en el terminal carboxi). A través de esta etiqueta, se puede formar un complejo con un marcador (por ejemplo, una proteína marcada con enzima), y este complejo preformado se usa como detector en el ELISA de MAC (Figura 2). Con esta configuración, se proporciona una prueba altamente sensible y específica para la detección de anticuerpos IgM de flavivirus. Es decisivo para la calidad de la prueba que a) se use la estructura dimérica antiparalela de la proteína E (Figura 1B), y que b) se use un complejo preformado (Figura 2), y no los componentes individuales en forma secuencial (Figura 3). Además, es altamente ventajoso usar una proteína que reconozca una etiqueta con múltiples sitios de unión para preformar el complejo añadiendo los anticuerpos IgM de la muestra que fueron capturados por las moléculas de unión a IgM inmovilizadas.

Los experimentos realizados en el transcurso de la presente invención (véase la sección de ejemplos a continuación; Figuras 3 y 4) han demostrado que el efecto técnico observado de la presente invención (es decir, una prueba altamente sensible y específica; Figura 3) no podría lograrse si a) las proteínas recombinantes E se usaran como monómeros en lugar de como dímeros antiparalelos (Figura 4A, B) y b) los antígenos no se proporcionaran como un complejo preformado con el marcador (por ejemplo, la proteína multivalente marcada con enzima) sino que se usaran secuencialmente (línea discontinua en la Figura 3). Por el otro lado, se muestra un desempeño inesperadamente ventajoso del procedimiento y sistema de ensayo de la presente invención, por ejemplo, en la Figura 5 en la que el sistema de ensayo de la invención se compara con un sistema de prueba establecido para TBE y en la Figura 6, en la que se ilustra el desempeño en el diagnóstico de infecciones recientes con virus TBE (Fig. 5A), virus Zika (Fig. 5B) y virus dengue (Figura 5C). El efecto técnico observado de la presente invención también se mostró en una prueba de comparación con ELISA de MAC convencionales usando formas diméricas de sE (Figura 9). Si bien la adición secuencial del dímero sE soluble y el marcador (Figura 9, línea punteada negra) resulta en una sensibilidad más débil en comparación con los ELISA de MAC convencionales (Figura 9, líneas continuas grises y discontinuas), la adición de un complejo preformado comprendiendo el dímero sE soluble y el marcador de acuerdo con la presente invención conduce a un aumento drástico de la sensibilidad, superior a todos los demás formatos (Figura 9, línea continua negra).

Por consiguiente, es esencial para el procedimiento de acuerdo con la presente invención añadir el complejo comprendiendo el dímero antiparalelo de sE y el marcador a los anticuerpos IgM inmovilizados en lugar de añadir los componentes del complejo por separado.

La provisión de un dímero antiparalelo de sE en el sistema de prueba de la presente es de particular relevancia para el desempeño de la presente invención. Las proteínas del flavivirus E están bien caracterizadas y consisten en un ectodominio, seguido de una región de tallo que une el ectodominio a un ancla de membrana que ancla la proteína en la membrana de la bicapa lipídica. El ectodominio contiene tres dominios, el Dominio I (con el extremo N-terminal revestido dentro del dominio), el Dominio II y el Dominio III, cada uno comprendiendo determinantes antigénicos que generalmente no se superponen. El ancla de membrana tiene dos segmentos transmembrana en los que el extremo C-terminal está presente sobre el lado del tallo/ectodominio de la membrana (véase, por ejemplo, 21 (para ETG), 22 (para dengue), 23 (para Zika)). Un gran número de secuencias de la proteína E del flavivirus son conocidas y están disponibles en las bases de datos de secuencias, los ejemplos representativos del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG) están disponibles en GenBank Núm. U27495; del virus dengue (VD), especialmente de VD serotipo 1 (DEN1) bajo GenBank Núm. AF226687, de VD serotipo 2 (DEN2) bajo GenBank Núm. U87411, de VD serotipo 3 (DEN3) bajo GenBank Núm. DQ863638, y de VD serotipo 4 (DEN4) bajo GenBank Núm. NC\_002640; y el virus Zika (VZ) bajo GenBank Núm. KJ776791 (todas las entradas de la base de datos de secuencia referidas en la presente solicitud son según la información del 20 de mayo de 2016).

Las E se define por comprender el ectodominio completo de la proteína E del flavivirus, opcionalmente comprendiendo partes o todo el dominio del tallo y careciendo del dominio de anclaje. El dímero sE de acuerdo con la presente invención se define como "antiparalelo", lo que significa que el dímero debe ser un agregado "cabeza a cola" (véase, por ejemplo, la Fig. 1B) en contraste con dímeros con otras configuraciones de subunidades.

La sE usada en la presente invención es, por definición, una proteína "soluble". Esto significa que el sE carece de toda ancla de membrana. En consecuencia, sE carece de aminoácidos constituyendo el segmento transmembrana (por ejemplo, comenzando en el aminoácido 454, 455 o 456 en TBE, 453, 454 o 455 en VD1,2 y 4, 451, 452 o 453 en VD3, y 462, 463 o 464 en VZ).

Las E de la presente invención puede contener partes de la región del tallo o incluso toda la región del tallo, por ejemplo, los aminoácidos entre el aminoácido 400 a 410 al aminoácido 454, 455 o 456 en ETG, los aminoácidos entre el aminoácido 399 a 409 al aminoácido 453, 454 o 455 en VD1,2 y 4, los aminoácidos entre el aminoácido 397 a 407 al aminoácido 451, 452 o 453 en VD3, los aminoácidos entre el aminoácido 408 a 418 al aminoácido 462, 463 o 464 en VZ.

De acuerdo con una realización preferente, el sE de acuerdo con la presente invención también carece de toda secuencia de la región del tallo.

La proteína sE de acuerdo con la presente invención se proporciona mediante tecnología recombinante debido a razones prácticas. En consecuencia, está compuesta principal o exclusivamente por las secuencias de la proteína E del flavivirus de origen natural o sus combinaciones (por ejemplo, proteínas E químicas conteniendo secuencias de la proteína E de dos o más flavivirus (por supuesto, aún formando dímeros sE antiparalelos), opcionalmente complementados o incrustados en secuencias naturales (es decir, secuencias que no se producen en flavivirus nativos). Por lo tanto, es posible incluir secuencias adicionales, que no son necesariamente de origen de flavivirus. Por ejemplo, se prefiere específicamente proporcionar una cola al sE, preferentemente en el extremo C-terminal, que puede servir como etiqueta. La etiqueta puede usarse para la purificación del sE, así como para la formación del complejo de acuerdo con la presente invención y para la detección del sE (y el complejo en su conjunto) después de unirse al anticuerpo IgM.

Las secuencias de sE también pueden estar sujetas a cambios específicos para mejorar las propiedades del sE, por ejemplo, tornándolo más fácil de producir, purificar, manipular, haciéndolo más antigénicamente más reactivo, cambiando sus propiedades antigénicas, cambiando sus propiedades de unión a inmunoglobulinas, etc. Asimismo, tales variantes de sE pueden aplicarse a la presente invención, a condición de que, por supuesto, la variación no conduzca a la incapacidad para formar las estructuras de dímero antiparalelo necesarias para la presente invención o deteriore las propiedades de unión a la IgM específica (o destruya la estructura del ectodominio).

Las moléculas de unión a IgM no son cruciales para la presente invención a condición de que sean lo suficientemente específicas como para unirse de manera eficaz a las moléculas de IgM en la muestra. Preferentemente, las moléculas de unión a IgM son anticuerpos anti-IgM o sus fragmentos de unión a IgM; estas moléculas de unión a IgM ya se han aplicado con éxito en los ELISA de MAC de la técnica anterior para IgM de flavivirus. También otros aglutinantes de afinidad con IgM son ampliamente conocidos en la técnica; algunos son derivados de anticuerpos o basados en anticuerpos, otros no. Los ejemplos de tales moléculas de unión a IgM usadas o sugeridas comercialmente son moléculas Affibody® anti-IgM (de abcam, por ejemplo, ab36088), Clq (documento US 5.077.391 A), la proteína de unión a manano (documento US 5.112.952 A, por ejemplo, ImmunoPure®), la proteína de unión a manosa (26), péptidos de unión inespecífica a IgM (documentos WO 98/26794 A1, EP 0 752 425 A2), péptidos de unión específica a IgM (por ejemplo, KAPTIN-M™ de Technogen o péptidos de acuerdo con el documento WO 2001/002001 A1). Otro ejemplo de una molécula de unión a IgM adecuada es un receptor de Fc específico para IgM, por ejemplo, el receptor para Fc de cadenas pesadas de IgM (Fc $\mu$ l), en particular, Faim 3/Toso y también CD351 (Fc $\mu$ / $\alpha$ R), o uno de sus fragmentos funcionales, preferentemente comprendiendo el dominio similar a Ig de Faim 3/Toso (como se describe en el documento WO 2016/059018 A1). La molécula de IgM específica ausar en el ensayo generalmente se puede seleccionar en función de la naturaleza de los virus específicos a probar, la muestra y la especificidad de la molécula

de unión de IgM (por ejemplo, que permita una discriminación específica entre IgM y IgG; las moléculas de unión a IgM preferentes son, por lo tanto, moléculas que muestran una mayor afinidad por IgM que por IgG, es decir, que permiten una unión selectiva de IgM de una muestra conteniendo IgG/IgM). Existen diversas tecnologías disponibles para crear moléculas de unión a IgM específicas basadas en andamiajes derivados de anticuerpos de ingeniería y secuencias de unión derivadas de anticuerpos aleatorios.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuado para detectar IgM específicas para el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), el virus dengue (VD), especialmente el serotipo 1 de VD (DEN1), el serotipo 2 de VD (DEN2), el serotipo 3 de VD (DEN3) y VD serotipo 4 (DEN4) y virus Zika (VZ).

El procedimiento de acuerdo con la presente invención se realiza preferentemente en muestras cuyo contenido potencial de IgM específicas de flavivirus es conocido. En consecuencia, todas las muestras preferentes son muestras posibles derivadas de sangre (muestras derivadas de sangre humana), especialmente muestras de suero o plasma y muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR).

La presente invención usa una molécula sE con una etiqueta que se une al marcador. En consecuencia, el dímero antiparalelo de sE comprende una etiqueta y la etiqueta une el marcador al dímero antiparalelo de sE. Los ejemplos de etiquetas adecuadas, por ejemplo, se revisan en la referencia 24 o 25 e incluyen poli-His, glutatión S-transferasa, proteína de unión a maltosa, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a inteína-quitina, etiquetas basadas en estreptavidina/biotina, His-Patch ThioFusion, etiquetas de afinidad en tándem, etiquetas de péptido/epítipo, etiquetas reportero, beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetil transferasa, peroxidasa de rábano picante, modificadores de ubiquitina, HaloTags®, Profinity eXact™, etiquetas basadas en el dominio PDZ, FLAG, c-Myc, GM-CSF, Twin StrepII, MBP, GST, almidón, fluoroapetita, diatomita, beta-GRP, ELP, RTX, ELK16, Fh8, 4AaCter, PagP, eGFP, heme, PYP, NusA, SUMO, Trx, XTEN, FATT, etc. (véase 24, 25). En una realización preferente, la etiqueta es una etiqueta Strep, o una etiqueta His.

En el procedimiento de la presente, se pueden aplicar todos los marcadores adecuados que puedan proporcionarse en un complejo con el dímero antiparalelo de sE. Preferentemente, todos los marcadores que se han establecido en los ELISA de MAC son adecuados, especialmente aquellos que ya se han aplicado en los ELISA de MAC de flavivirus. Por consiguiente, los marcadores preferentes se seleccionan del grupo que consiste en un marcador de afinidad, un marcador de fluorescencia, un marcador radiactivo, un marcador de ácido nucleico, un marcador cromogénico, un marcador de luminiscencia, un marcador magnético o sus combinaciones. Por ejemplo, el marcador puede seleccionarse de un cromógeno, una enzima, un catalizador, un fluoróforo, un coloide de oro y una etiqueta visual directa. En el caso de una etiqueta visual directa, se puede usar una partícula coloidal metálica o no metálica, una partícula colorante, una enzima o un sustrato, un polímero orgánico o una partícula de látex. Un gran número de enzimas adecuadas para su uso como etiquetas se desvelan, por ejemplo, en los documentos US 4.366.241 A; 4.843.000 A y 4.849.338 A. Los marcadores enzimáticos adecuados en la presente invención incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, preferentemente peroxidasa de rábano picante. El marcador enzimático se puede usar solo o en combinación con una segunda enzima, que está en solución. En la presente invención, un anticuerpo secundario unido a la peroxidasa de rábano picante, que después se hace reaccionar con su sustrato DAB y produce un cambio de color detectable visualmente, preferentemente logra la detección del complejo. También se pueden usar otros procedimientos de marcado, tal como biotilación o marcado con un resto fluorescente como FITC, PE o una proteína fluorescente. También puede usarse un segundo anticuerpo marcado, preferentemente monoclonal, para detectar y cuantificar los complejos inmunes. Si el marcador es biotina, la detección puede realizarse añadiendo una enzima marcada con avidina o estreptavidina en una etapa adicional. La adición de un sustrato de la enzima, como es bien conocido en el estado de la técnica, permite la cuantificación del marcador y, en consecuencia, del anticuerpo en forma inmunocomplejada.

En una realización preferente, el complejo usado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende un anticuerpo marcado, especialmente un anticuerpo siendo específico para una etiqueta del dímero antiparalelo de sE; una proteína de unión a etiqueta Strep, especialmente una proteína de unión a etiqueta Strep comprendiendo un marcador como se mencionó anteriormente.

El soporte sólido usado en el presente procedimiento puede ser cualquier soporte sólido adecuado que permita (1) la unión de las moléculas de unión de IgM y (2) la unión de la IgM en la muestra a las moléculas de unión de IgM unidas a la superficie sólida. El soporte sólido también debe permitir la manipulación adecuada de las muestras de IgM inmovilizadas en la unión al complejo y la detección del evento de unión del complejo a la IgM inmovilizada. Por lo tanto, el soporte sólido es preferentemente un material ya usado en ELISA, especialmente en ELISA de MAC. Por lo tanto, los soportes sólidos preferentes son una placa de microtitulación, un microchip biológico, un cordón, un disco, una partícula magnética u otros recipientes o superficies de plástico, un sensor de fibra óptica, un portaobjetos de vidrio o una membrana, preferentemente una membrana de nitrocelulosa, una membrana de politetrafluoretileno, una membrana de acetato de celulosa o una membrana de nitrato de celulosa. Preferentemente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se realiza en un sistema automatizado. Por consiguiente, todos los soportes sólidos establecidos o adecuados para sistemas de detección automatizados pueden aplicarse en el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, el procedimiento y la configuración de prueba de acuerdo con la presente invención se pueden adaptar fácilmente a sistemas automatizados ya existentes, disponibles comercialmente, tal como Analizador de inmunoensayo Architect (Abbott); Inmunoanalizador Vidas (Biomerieux);

Analizadores de inmunoensayo automatizados Cobas y Elecsys (Roche Diagnostics); Analizador Liaison (Diasorin); Analizadores Euroimmun (Euroimmun), etc.

5 Dependiendo de la naturaleza del marcador, puede ser necesario en el procedimiento de la presente añadir sustancias adicionales para finalmente detectar el marcador. La adición de otras sustancias genera una señal o activa el marcador creando una señal detectable (o creando otro marcador que después se somete a la creación de una señal). Esta señal puede finalmente detectarse y medirse para detectar y eventualmente también cuantificar la cantidad de anticuerpos IgM específicos para flavivirus unidos a las moléculas de unión de IgM en la superficie sólida. Esto permite la conclusión de si la muestra contenía o no IgM específicas para flavivirus (y en caso afirmativo, en qué cantidad). Esto es indicativo de si la persona de la que se obtuvo esta muestra se vio afectada por una infección por flavivirus.

10 Con la configuración del presente ensayo también es posible discriminar entre diferentes infecciones por flavivirus e incluso discriminar entre los serotipos de dengue y detectar múltiples infecciones con diferentes flavivirus.

15 De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, el procedimiento aplica sE de un flavivirus relacionado distantemente con los flavivirus patógenos importantes para el ser humano (tal como los virus Rio Bravo, Modoc, Yokose, del murciélago Entebbe, Barkedji, Lammi) como un control para determinar anticuerpos de flavivirus con reacción cruzada amplia. Un ejemplo específicamente preferente para dichos E de control es el sE del virus Rio Bravo. El uso de tal sE puede ser ventajoso para optimizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención para controlar la señal de fondo específica de anticuerpos con reacción cruzada amplia. El término "anticuerpos con reacción cruzada amplia (flavivirus)" se refiere a anticuerpos que tienen reacción cruzada con todos o la mayoría de los flavivirus y distingue de "anticuerpos con reacción cruzada con serocomplejo", tal como los anticuerpos teniendo reacción cruzada, por ejemplo, entre los serotipos de dengue. Con el sE del virus Rio Bravo, se pueden determinar (y eliminar de los resultados generales) no solo las señales de fondo inespecíficas, sino también las señales de fondo específicas de anticuerpos de flavivirus con reacción cruzada amplia.

20 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un kit para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Este kit para uso de acuerdo con la presente invención comprende:

- 25 - un soporte sólido comprendiendo moléculas de unión a IgM inmovilizadas y
- un complejo comprendiendo
  - (i) un dímero antiparalelo de la proteína E de flavivirus soluble (sE) y
  - (ii) un marcador.

30 El kit para uso de acuerdo con la presente invención puede comprender además medios para detectar el marcador, preferentemente medios para detectar un marcador de afinidad, un marcador de fluorescencia, un marcador radioactivo, un marcador cromogénico, un marcador de luminiscencia o un marcador magnético.

Preferentemente, el kit para uso de acuerdo con la presente invención, además comprende una muestra o un recipiente conteniendo una muestra y/o un estándar comprendiendo anticuerpos IgM específicos para un flavivirus.

35 Como ya se indicó anteriormente, es ventajoso realizar el presente procedimiento con sE del virus Rio Bravo u otro flavivirus relacionado de forma distante con los flavivirus patógenos humanos importantes para determinar el fondo específico de los anticuerpos de reacción cruzada con flavivirus amplia. Por consiguiente, el kit para uso de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente tales sE o el complejo comprendiendo tales sE.

40 El procedimiento de acuerdo con la presente invención se realiza preferentemente como un sistema automatizado. Por consiguiente, el kit para uso de acuerdo con la presente invención también comprende preferentemente componentes que son necesarios o útiles para llevar a cabo dicha detección automatizada. De acuerdo con una realización preferente, el presente kit comprende además un sistema de detección automatizado, comprendiendo preferentemente un dispositivo de transporte de muestras, un dispositivo de detección, una unidad de procesamiento de ordenador y/o una pantalla para mostrar la señal de la unidad de detección procesada por programas de software ejecutados con la unidad de procesamiento de ordenador.

45 Los componentes específicamente preferentes de dicho sistema automatizado son aquellos que ya forman parte de sistemas automatizados disponibles comercialmente, tal como el Analizador de inmunoensayo Architect (Abbott); Inmunoanalizador Vidas (Biomérieux); Analizadores de inmunoensayo automatizados Cobas y Elecsys (Roche Diagnostics); Analizador Liaison (Diasorin); Analizadores Euroimmun (Euroimmun), etc. mencionados anteriormente.

50 El kit se puede proporcionar en una configuración comercial como un kit listo para usar. Preferentemente, los componentes del kit están empaquetados en una envoltura estéril, preferentemente en una envoltura de plástico transparente estéril. Los componentes pueden estar preesterilizados, proporcionarse mediante producción estéril o pueden ser esterilizados al final del procedimiento de producción, es decir, incluso después de envolver los componentes del kit para el embalaje final. El kit puede estar acompañado de folletos del producto adecuados con instrucciones de uso y finalmente entregarse en una caja de producto (por ejemplo, una caja de producto sellada) para

suventa. Si el kit se comercializa como un sistema automatizado, por lo general, no todo el sistema debe estar envuelto estérilmente. Por consiguiente, se prefiere proporcionar al menos el soporte sólido y/o el complejo y/o el sE y el marcador empacados en una envoltura estéril, preferentemente en una envoltura de plástico transparente estéril.

5 La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y las figuras, pero sin limitarse a los mismos.

Figura 1: Ilustración de antígenos usados en la presente invención; A: Representación esquemática de una partícula de flavivirus en forma inmadura (izquierda) y madura (derecha). Proteínas virales: E - envoltura; prM - precursor de la proteína de membrana; M - proteína de membrana; C - proteína de la cápside; sE: forma soluble de E truncada en el extremo C-terminal que carece del denominado "tallo" y del ancla transmembrana. B: diagrama de cinta de la estructura cristalina de sE del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG). Panel superior: vista superior (mostrando la estructura dimérica antiparalela de esta proteína); panel inferior: vista lateral. Codificación de color de los tres dominios sE: Dominio I (DI) - rojo; dominio II (DII) - amarillo; dominio III (DIII) - azul. Codificación de color de los tres dominios sE: Dominio I (DI) - gris; dominio II (DII) - gris claro; dominio III (DIII) - gris oscuro. C: diagramas de cinta de formas monoméricas solubles de E en sus vistas laterales (1° panel: monómero sE (TBE); 2° panel: sEΔFP (monómero sE de ETG en el que los aminoácidos 98 a 111 fueron reemplazados por un conector GGGG); 3° panel: Monómero DI + DII (TBE); 4° panel: monómero pr + sE (DEN2), FP - péptido de fusión.

Figura 2: Representación esquemática del principio de prueba en la presente invención; Formato ELISA de MAC (captura de anticuerpos IgM) usado en la invención; HRP - peroxidasa de rábano picante.

20 Figura 3: Curvas de titulación de un acervo de sueros de infecciones recientes por el virus ETG humano en tres ELISA de MAC diferentes. Línea continua negra: ensayo de acuerdo con la invención. Línea continua gris: ensayo convencional de acuerdo con las referencias (4), (17). Línea punteada negra: ensayo de acuerdo con la invención pero usando adición secuencial de los componentes detectores.

Figura 4: ELISA de MAC usando antígenos E monoméricos y diméricos en el complejo detector. A: Se analizó una dilución 1:100 de un acervo de sueros de infecciones recientes por virus ETG humano en el ensayo inventivo usando el dímero sE de ETG (columna negra), sE ΔFP de ETG, DI + II de ETG y pr-sE de ETG (columnas sombreadas en gris) como antígenos en el complejo detector. B: Se analizaron cuatro muestras de suero de infecciones recientes por virus NO humano a una dilución de 1:100 en el formato del ensayo inventivo usando el sE monomérico de NO en el complejo detector (columnas negras) en comparación con un ELISA de MAC que usa partículas de virus NO enteras purificadas como antígeno (columnas grises). HRP - peroxidasa de rábano picante; mab - anticuerpo monoclonal.

Figura 5: Resultados de las determinaciones de IgM de ETG en 31 muestras de suero humano de infecciones recientes por virus ETG en el ensayo de la invención (puntos negros) en comparación con el ELISA de MAC convencional que usa virus ETG infeccioso purificado (cuadrados abiertos), expresado en unidades arbitrarias. Ns: no significativo. Las barras indican los intervalos de confianza promedio de +/- 95%. Dilución de suero - 1:1000.

Figura 6: Demostración de la estructura oligomérica de proteínas sE recombinantes de los virus ETG, Zika, NO y DEN4. SDS-PAGE de proteínas sE recombinantes sin (-) y después de la reticulación química con DMS (+). Tinción con azul de Coomassie.

Figura 7: Resultados del análisis de muestras de suero de infecciones recientes por flavivirus usando el ensayo de la invención con un panel de antígenos sE de flavivirus como se indica en el eje x. A: infección por el virus ETG; B: infección por el virus Zika; C: infección por el virus dengue 2; D: infección por el virus dengue 3; E: infecciones dobles del virus Zika y dengue 2; F: infección por el virus dengue 3. Dilución de suero - 1:100.

Figura 8: Resultados del análisis de muestras de suero de infecciones recientes por dengue usando el ensayo de la invención con antígenos sE de serotipo 1 a 4 dengue como se indica en el eje x. A: infección por el virus dengue 1; B: infección por el virus dengue 2; C: infección por el virus dengue 3; D: infección por el virus dengue 4. Dilución de suero - 1:100.

Figura 9: Curvas de titulación de un acervo de suero de infecciones recientes por el virus ETG humano en cuatro ELISA de MAC diferentes. Línea continua negra: ensayo de acuerdo con la invención. Línea punteada negra: Ensayo de acuerdo con la invención pero usando adición secuencial de los componentes del detector. Línea continua gris: ELISA de MAC de ETG convencional, usando el mismo sE recombinante con etiqueta Strep que en el complejo inventivo, pero un anticuerpo monoclonal específico de proteína E marcado con biotina (mab) y estreptavidina-HRP para la detección. Línea discontinua gris: ELISA de MAC de ETG convencional, usando un dímero sE sin etiquetar (forma aislada del virus ETG purificado, Heinz et al. 1991, J Virol 65 (10): 5579-5583) y un anticuerpo monoclonal específico de proteína E marcado con biotina (mab) y estreptavidina-HRP para la detección.

### Ejemplos:

**Abreviaturas:**

	DI, II, III	dominio I, II, III
	DEN	dengue
	DMS	dimetil suberimidato
5	ELISA	ensayo inmunosorbente ligado a enzimas
	FP	péptido de fusión
	HRP	peroxidasa de rábano picante
	JE	encefalitis japonesa
	ELISA de MAC	ELISA de captura de anticuerpos IgM
10	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	RB	Rio Bravo
	SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
	sE	E soluble
	ETG	encefalitis transmitida por garrapatas
15	NO	Nilo Occidental

**Materiales y procedimientos**

**Muestras de suero humano**

Se enviaron muestras de suero de pacientes al Departamento de Virología, Universidad de Medicina de Viena, y se almacenaron a -20°C.

**20 Producción e inactivación de virus**

La producción de virus se realizó esencialmente como se describe en las referencias (3, 19). En resumen, se infectaron células primarias de embriones de pollo con el virus ETG, cepa Neudörfel (GenBank # U27495) o virus NO, cepa NY99 (GenBank # AF196835). 24-48 horas p.i. el sobrenadante celular se recogió y se clarificó por centrifugación. El virus NO se inactivó con formalina (1: 2000) durante 24 horas 37°C. Las suspensiones con virus se concentraron por ultracentrifugación y se purificaron por centrifugación de velocidad zonal seguida de centrifugación de equilibrio de gradiente de densidad de sacarosa.

**Producción de proteínas E recombinantes**

Los antígenos recombinantes se produjeron en el Sistema de expresión de Drosophila (Invitrogen) con una doble etiqueta Strep como se describe en las referencias (5, 18-20). El vector de expresión pT389 codifica la secuencia de señal de exportación Bip, un sitio de escisión de enteroquinasa y la doble etiqueta strep. Las células de Drosophila Schneider 2 se transfectaron de manera estable usando blasticidina para selección. La expresión de proteínas se indujo mediante la adición de CuSO<sub>4</sub> y los sobrenadantes se recogieron 7-10 días después de la inducción. Los antígenos se purificaron mediante cromatografía de afinidad con columnas de estreptactina (IBA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

35 Las siguientes proteínas recombinantes se expresaron y usaron como antígenos en el ELISA de MAC de la invención:

40 Virus ETG: sE - aminoácidos E 1 a 400; DI + II de Virus ETG - aminoácidos E 1 a 302; sE ΔFP de Virus ETG - aminoácidos 1 a 400 (los aminoácidos 98-111 fueron reemplazados por un conector GGGG); pr + sE de Virus ETG [aminoácidos sE 1 a 400; prM 1 a 129 con una mutación en el sitio de escisión de furina como se describe en la referencia (2); prM y sE se conectaron mediante el sitio de escisión de ataque químico de la proteasa del virus del tabaco como se describe en la referencia (7)]

Virus NO: sE - aminoácidos E 1 a 400; Virus DEN: sE - aminoácidos E 1 a 399 para VD1,2 y 4; 1 a 397 para VD3; Virus Zika: sE - aminoácidos E 1 a 408; Rio Bravo: sE - aminoácidos E 1 a 395

ETG(Neudorfel); GenBank # U27495

NO (NY99); GenBank # AF196835

Dengue 1 (FGA/89); GenBank # AF226687

Dengue 2 (16681); GenBank # U87411

Dengue 3 (CH53489); GenBank # DQ863638

Dengue 4 (11070); GenBank # NC\_002640

5 Zika (H/PF/2013); GenBank # KJ776791

Rio Bravo (RiMAR); GenBank # AF144692

### **Marcado de virus y mab**

10 El virus ETG infeccioso purificado y el anticuerpo monoclonal específico de NO se marcaron con peroxidasa de rábano picante (HRP) usando el "kit de marcado Lightning link HRP" (Innova Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **Reticulación química y SDS-PAGE**

15 La reticulación química de proteínas recombinantes se realizó esencialmente como se describió anteriormente (1). Brevemente, se añadió dimetil suberimidato 10 mM (DMS; Pierce) a las proteínas recombinantes en tampón de trietanolamina pH 8,0 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reticulación se detuvo mediante la adición de etanolamina a una concentración final de 10 mM. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético, se sometieron a SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 5% en condiciones no reductoras como se describe en la referencia (9) y se tiñeron con azul de Coomassie R-250.

### **ELISA de MAC**

20 Para todos los formatos de ELISA de MAC, se revistieron placas Nunc MaxiSorp durante la noche a 4°C con 50 µl/pocillo de inmunoglobulina de conejo contra cadenas µ humanas (DAKO) diluida 1:1000 en tampón de carbonato (pH 9,6; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,159% y NaHCO<sub>3</sub> 0,293%). Después de la eliminación de la solución de revestimiento, se añadieron muestras de suero en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) pH 7,4 (conteniendo 2% de Tween 20 y 2% de suero de oveja) y se incubaron durante 45 minutos a 37°C.

25 Después se extrajeron muestras de suero y después de tres etapas de lavado con PBS pH 7,4 se aplicaron diferentes sistemas de detección de la siguiente manera:

a) ELISA de MAC de ETG convencional (4, 17): el virus ETG infeccioso marcado con peroxidasa se incubó durante 30 minutos a 37°C.

30 b) ELISA de MAC de NO convencional: el virus NO inactivado con formalina se incubó durante 30 minutos a 37°C seguido de una incubación de 30 minutos con un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa específico del virus NO.

c) Complejo de la invención preformado: las proteínas sE y la estreptactina-HRP (IBA) se mezclaron en concentraciones óptimas predeterminadas, se incubaron durante 30 minutos a 500 rpm a temperatura ambiente y se almacenaron a -80°C o se usaron directamente. El complejo se incubó durante 30 minutos a 37°C.

35 d) Adición secuencial de los componentes del complejo de la invención en las mismas concentraciones que las usadas en el complejo: se incubó sE durante 30 minutos a 37°C seguido de una incubación de 30 minutos con estreptactina-HRP.

40 e) ELISA de MAC de ETG convencional, usando el mismo sE recombinante con etiqueta Strep que en el complejo de la invención, pero un anticuerpo monoclonal específico de proteína E marcado con biotina (mab) y estreptavidina-HRP para la detección: se incubó sE durante 30 minutos a 37°C seguido de una incubación de 30 minutos con el mab y una incubación de 30 minutos con la estreptavidina-HRP.

f) ELISA de MAC de ETG convencional, usando un dímero sE sin etiquetar (aislado del virus ETG purificado, Heinz 1991) y un anticuerpo monoclonal específico de proteína E marcado con biotina (mab) y estreptavidina-HRP para la detección: se incubó sE durante 30 minutos a 37°C seguido de una incubación de 30 minutos con el mab y una incubación de 30 minutos con la estreptavidina-HRP.

45 Después, las placas se lavaron tres veces y se añadieron 50 µl de sustrato (o-fenilendiamina; Sigma). La enzima se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se detuvo mediante la adición de 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

### **Resultados**

**Demostración de que 1.) el ELISA de MAC de acuerdo con la invención es equivalente a un ELISA de MAC en el que se usa el virus ETG infeccioso marcado con HRP para la detección y de que 2.) este desempeño solo se logra cuando los componentes del detector se añaden como un complejo preformado y no cuando los componentes individuales se añaden secuencialmente.**

5 Con el fin de evaluar la calidad del ensayo de acuerdo con la invención, se ha comparado su desempeño con a) el de un ELISA de MAC establecido que usa el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG) infecciosa purificada marcada por HRP como detector (4, 17) y b) un formato de ensayo en el que los componentes individuales del complejo detector inventivo se añadieron secuencialmente. Como se puede observar en la Figura 3, la sensibilidad de la  
10 detección de IgM con el ensayo de la invención en un acervo de muestras de suero de infecciones recientes por virus ETG fue equivalente al ensayo convencional. Por el contrario, se obtuvo una señal mucho más baja cuando los componentes del detector individual (dímero sE y estreptactina HRP) se añadieron secuencialmente (Fig. 3).

La Figura 3 muestra las curvas de titulación de un acervo de sueros de infecciones recientes por el virus de la ETG humana en tres ELISA de MAC diferentes (línea continua negra: ensayo de acuerdo con la invención; línea continua gris: ensayo convencional de acuerdo con las referencias (4, 17); línea punteada negra: Ensayo de acuerdo con la  
15 invención pero usando la adición secuencial de los componentes del detector).

**Demostración de que el excelente desempeño del ELISA de MAC de acuerdo con la invención depende de la estructura dimérica antiparalela de sE usada en el complejo detector.**

Para analizar los requisitos estructurales del antígeno usado en el complejo detector, se ha comparado el dímero sE del virus ETG con diferentes formas monoméricas de esta proteína. Esto incluyó 1.) sE en la que se eliminó un elemento de secuencia requerido para la dimerización (aminoácidos 98 a 111, péptido de fusión FP) en el dominio II (sE  $\Delta$ FP), 2.) una construcción compuesta solo por los dominios I + II (DI + II) y 3.) un monómero sE en complejo con pr (pr + sE).  
20

Los resultados en la Figura 4A muestran que el desempeño de los ensayos con las formas monoméricas (columnas sombreadas en gris, Fig. 4A) se reduce drásticamente en comparación con el ensayo inventivo que usa sE dimérico (columna negra, Fig. 4A).  
25

Además, se ha analizado el formato de ensayo de la invención en otro sistema de flavivirus [virus del Nilo Occidental (NO)] que, al igual que el virus de la encefalitis japonesa (JE), en contraste con ETG y otros flavivirus (5, 8, 10, 11, 15) - produce una forma monomérica de sE tras la producción como una proteína recombinante (6, 8, 13). De acuerdo con los resultados obtenidos con las formas monoméricas de ETG sE (Fig. 4A), se observaron señales muy bajas con el monómero de virus NO sE en comparación con un ELISA de MAC usando partículas de virus enteras purificadas (Fig. 4B).  
30

Estos resultados demuestran que la calidad del ensayo de la invención depende de la estructura antiparalela nativa del antígeno flavivirus E en el complejo detector.

La Figura 4 muestra los ELISA de MAC usando antígenos E monoméricos y diméricos en el complejo detector (A: Se analizó una dilución 1:100 de un acervo de sueros de infecciones recientes por virus ETG humano en el ensayo de la invención usando el dímero sE de ETG (columna negra), sE  $\Delta$ FP de ETG, DI + II de ETG y pr-sE de ETG (columnas sombreadas en gris) como antígenos en el complejo detector; B: Se analizaron cuatro muestras de suero de infecciones recientes por virus NO humano a una dilución de 1:100 en el formato de ensayo de la invención usando el sE monomérico de NO en el complejo detector (columnas negras) en comparación con un ELISA de MAC usando partículas de virus NO purificadas como antígeno (columnas grises); HRP - peroxidasa de rábano picante; mab - anticuerpo monoclonal).  
35  
40

**Demostración de que el ELISA de MAC de acuerdo con la invención es equivalente al formato convencional usando un panel de 31 muestras de suero humano de infecciones recientes por virus ETG.**

Para comparar la sensibilidad del formato de ensayo de la invención con el de un ELISA de MAC convencional usando virus ETG infeccioso purificado, se ha analizado un panel de 31 muestras de suero de infecciones recientes de virus ETG humano en ambos ensayos, usando un suero estándar positivo para determinar las unidades arbitrarias de IgM TBE como se describe (17). La evaluación de los resultados reveló la ausencia de diferencias estadísticamente significativas y la equivalencia completa de ambos ensayos (Fig. 5).  
45

La Figura 5 muestra los resultados de las determinaciones de ETG IgM de 31 muestras de suero humano de infecciones recientes de virus ETG en el ensayo de la invención (puntos negros) en comparación con el ELISA de MAC convencional usando virus ETG infeccioso purificado (cuadrados abiertos), expresado en unidades arbitrarias (Ns - no significativo). Las barras indican los intervalos de confianza promedio de +/- 95%. Dilución de suero - 1: 1000.  
50

**Demostración de que el ELISA de MAC de acuerdo con la invención también funciona para otros flavivirus patógenos humanos importantes que producen proteínas sE recombinantes diméricas y permite el diagnóstico serológico de infecciones recientes de virus de ETG, dengue y Zika humanos con alta especificidad.**  
55

La invención depende del uso de la estructura antiparalela nativa de sE. La formación de tales dímeros tras la expresión de proteínas recombinantes difiere entre flavivirus, específicamente las proteínas sE recombinantes de JE y NO son monoméricas (6, 8, 13); compárese con la Fig.1). Sin embargo, las proteínas sE de otros flavivirus patógenos humanos importantes pueden formar dímeros (Fig. 6) y, por lo tanto, podrían usarse directamente en el formato de ensayo de la invención (Fig. 7).

Para este propósito, se han expresado y purificado proteínas sE recombinantes de virus dengue (DEN) y Zika y se ha analizado su estructura oligomérica mediante la reticulación con DMS en comparación con las proteínas sE de los virus ETG (predominantemente diméricos) y NO (predominantemente monoméricos). Como se puede observar en la Figura 6, las proteínas sE tanto de DEN4 como de Zika produjeron patrones de reticulación consistentes con una estructura dimérica, similar al virus ETG. Los resultados obtenidos con los serotipos DEN 1,2 y 3 de proteínas sE fueron similares a los de DEN4.

La Figura 6 demuestra la estructura oligomérica de proteínas sE recombinantes de los virus ETG, Zika, NO y DEN4 (SDS-PAGE de proteínas sE recombinantes sin (-) y después de la reticulación química con DMS (+). Tinción con azul de Coomassie).

Para demostrar la idoneidad de los antígenos sE del virus DEN y Zika para el ensayo de la invención, se han analizado muestras de suero humano de infecciones recientes con estos virus en paralelo con sE de ETG, serotipos DEN 1 a 4, virus Zika y Rio Bravo. La última sE se usa como un antígeno de control de reacción cruzada que está relacionado de forma distante con todos los flavivirus patógenos humanos relevantes (16) y permite la determinación de la contribución de los anticuerpos de reacción cruzada de flavivirus amplia a la señal de ensayo. Se muestran en la Figura 7 ejemplos de resultados obtenidos con tales muestras de suero en los ELISA de MAC de la invención usando sE de dengue serotipo 1,2,3,4; de Zika, de Rio Bravo y de ETG como antígenos. Los datos revelan el excelente desempeño del ensayo, permitiendo un diagnóstico serológico específico del tipo de infecciones importantes por flavivirus en humanos. El panel E muestra que incluso las infecciones dobles recientes con los virus dengue y Zika pueden resolverse.

Las infecciones secuenciales con diferentes serotipos DEN son especialmente propensas al desarrollo de anticuerpos de reacción cruzada con flavivirus amplia que pueden presentar problemas en el serodiagnóstico de tales infecciones (12, 14). La inclusión de un antígeno de flavivirus independiente que no desempeña un papel como patógeno humano (sE del virus Rio Bravo) permite la detección de la fracción de reacción cruzada de fondo y, por lo tanto, puede ayudar a identificar el virus DEN recientemente infectado mediante la comparación de la extensión de las señales en los ensayos con los cuatro serotipos (Fig. 7F).

La Figura 7 muestra los resultados del análisis de muestras de suero de infecciones recientes por flavivirus usando el ensayo de la invención con un panel de antígenos sE de flavivirus como se indica en el eje x (A: infección por virus ETG; B: infección por virus Zika; C: infección por virus dengue 2; D: infección por virus dengue 3; E: infecciones por virus Zika y dengue 2; F: infección por virus dengue 3; dilución del suero - 1:100).

En la Fig. 8 se muestran ejemplos adicionales para el diagnóstico específico de serotipo de infecciones por el virus dengue usando el ensayo de la invención.

La Figura 8 muestra los resultados del análisis de muestras de suero de infecciones recientes por dengue usando el ensayo de la invención con antígenos sE de serotipo 1 a 4 dengue como se indica en el eje x (A: infección por el virus dengue 1; B: infección por el virus dengue 2; C: Infección por el virus dengue 3; D: infección por el virus dengue 4; dilución sérica - 1: 100).

#### **Demostración de que el ELISA de MAC de acuerdo con la invención es superior en comparación con los formatos ELISA de MAC convencionales que también usan formas diméricas de sE.**

A fin de demostrar el efecto técnico mejorado del ensayo de la invención, se ha comparado su desempeño con a) el ensayo de acuerdo con la invención pero usando la adición secuencial de los componentes del detector, b) un ELISA de MAC de ETG convencional usando el mismo sE con etiqueta Strep como en el complejo de la invención, pero un anticuerpo monoclonal específico de proteína E marcado con biotina (mab) y estreptavidina-HRP para detección y c) un ELISA de MAC de ETG convencional, usando un dímero sE no etiquetado (virus ETG purificado de forma aislada, Heinz 1991), y un anticuerpo monoclonal específico de proteína E marcado con biotina (mab) y estreptavidina-HRP para la detección. Como se puede observar en la Figura 9, la sensibilidad de la detección de IgM con el ensayo inventivo en un acervo de muestras de suero de infecciones recientes por virus ETG humano es inesperadamente más sensible que la detección con procedimientos similares descritos en la técnica.

Los resultados en la Figura 9 muestran que añadir los componentes del detector como un complejo preformado de acuerdo con la invención (Fig. 9 línea continua negra) aumenta drásticamente el desempeño en comparación con la adición secuencial de los componentes del detector (Fig. 9 línea punteada negra). Además, los resultados demuestran que con los ELISA de MAC convencionales usando el mismo antígeno sE recombinante (Fig. 9 línea continua gris) el desempeño de la detección de IgM es mucho menor en comparación con el ensayo de acuerdo con la invención. Se obtuvieron los mismos resultados con los ELISA de MAC convencionales usando dímeros sE sin etiquetar aislados del virus ETG (Fig. 9 línea discontinua gris).

Por lo tanto, los datos revelan que la presente invención proporciona un ensayo de detección de IgM altamente sensible cuyo desempeño podría mejorarse drásticamente con respecto a los ELISA de MAC convencionales existentes que usan dímeros sE.

### Referencias

- 5 1. Allison, S. L., J. Schalich, K. Stiasny, C. W. Mandl, C. Kunz, and F. X. Heinz. 1995. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol* 69:695-700.
2. Elshuber, S., S. L. Allison, F. X. Heinz, and C. W. Mandl. 2003. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* 84:183-91.
- 10 3. Heinz, F. X., and C. Kunz. 1981. Homogeneity of the structural glycoprotein from European isolates of tick-borne encephalitis virus: comparison with other flaviviruses. *J Gen Virol* 57:263-74.
4. Heinz, F. X., M. Roggendorf, H. Hofmann, C. Kunz, and F. Deinhardt. 1981. Comparison of two different enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin M antibodies against tick-borne encephalitis virus in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 14:141-6.
- 15 5. Jarmer, J., J. Zlatkovic, G. Tsouchnikas, O. Vratskikh, J. Strauss, J. H. Aberle, V. Chmelik, M. Kundi, K. Stiasny, and F. X. Heinz. 2014. Variation of the specificity of the human antibody responses after tick-borne encephalitis virus infection and vaccination. *J Virol* 88:13845-57. doi: 10.1128/JVI.02086-14
6. Kanai, R., K. Kar, K. Anthony, L. H. Gould, M. Ledizet, E. Fikrig, W. A. Marasco, R. A. Koski, and Y. Modis. 2006. Crystal Structure of West Nile Virus Envelope Glycoprotein Reveals Viral Surface Epitopes. *J. Virol.* 80:11000-11008.
- 20 7. Li, L., S. M. Lok, I. M. Yu, Y. Zhang, R. J. Kuhn, J. Chen, and M. G. Rossmann. 2008. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science* 319:1830-4.
8. Luca, V. C., J. AbiMansour, C. A. Nelson, and D. H. Fremont. 2012. Crystal structure of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *J Virol* 86:2337-46. doi: JVI.06072-11 [pii] 10.1128/JVI.06072-11
9. Maizel, J. V., Jr. 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. *Methods Virol* 5:179-246.
- 25 10. Modis, Y., S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison. 2003. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6986-91.
11. Modis, Y., S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison. 2005. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol* 79:1223-31. doi: 10.1128/JVI.79.2.1223-1231.2005.
- 30 12. Musso, D., and D. J. Gubler. 2016. Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews* 29:487-524. doi: 10.1128/cmr.00072-15.
13. Nybakken, G. E., C. A. Nelson, B. R. Chen, M. S. Diamond, and D. H. Fremont. 2006. Crystal Structure of the West Nile Virus Envelope Glycoprotein. *J. Virol.* 80:11467-11474.
- 35 14. Peeling, R. W., H. Artsob, J. L. Pelegriano, P. Buchy, M. J. Cardoso, S. Devi, D. A. Enria, J. Farrar, D. J. Gubler, M. G. Guzman, S. B. Halstead, E. Hunsperger, S. Kliks, H. S. Margolis, C. M. Nathanson, V. C. Nguyen, N. Rizzo, S. Vazquez, and S. Yoksan. 2010. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Micro.*
15. Rey, F. A., F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, and S. C. Harrison. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375:291-8.
- 40 16. Simmonds, P., P. Becher, M. S. Collett, E. A. Gould, F. X. Heinz, G. Meyers, T. Monath, A. Pletnev, C. M. Rice, K. Stiasny, H. J. Thiel, A. Weiner, and J. Bukh. 2011. Family Flaviviridae, p. 1003-1020. In A. M. Q. King, E. Lefkowitz, M. J. Adams, and E. B. Carstens (ed.), *Virus Taxonomy. IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego.
17. Stiasny, K., J. H. Aberle, V. Chmelik, U. Karrer, H. Holzmann, and F. X. Heinz. 2012. Quantitative determination of IgM antibodies reduces the pitfalls in the serodiagnosis of tick-borne encephalitis. *J Clin Virol* 54:115-20. doi: S1386-6532(12)00065-0 [pii] 10.1016/j.jcv.2012.02.016.
- 45 18. Tsouchnikas, G., J. Zlatkovic, J. Jarmer, J. Strauss, O. Vratskikh, M. Kundi, K. Stiasny, and F. X. Heinz. 2015. Immunization with Immune Complexes Modulates the Fine-Specificity of Antibody Responses to a Flavivirus Antigen. *J Virol*. doi: 10.1128/JVI.00938-15.
- 50 19. Zlatkovic, J., K. Stiasny, and F. X. Heinz. 2011. Immunodominance and functional activities of antibody responses to inactivated West Nile virus and recombinant subunit vaccines in mice. *J Virol* 85:1994-2003. doi: JVI.01886-10 [pii] 10.1128/JVI.01886-10.

20. Zlatkovic, J., G. Tsouchnikas, J. Jarmer, C. Koessl, K. Stiasny, and F. X. Heinz. 2013. Aluminum hydroxide influences not only the extent but also the fine specificity and functional activity of antibody responses to tick-borne encephalitis virus in mice. *J Virol* 87:12187-95. doi: JVI.01690-13 [pii] 10.1128/JVI.01690-13.

21. Mandl et al. 1989, *J. Virol.* 63:564-571.

5

22. Zhang et al. 2004, *Structure* 12:1607-1618.

23. Dai et al. 2016, *Cell Host & Microbe* 19:696-704.

24. Kimple et al. 2015, *Curr. Protoc. Protein Sci.* 73: Unit-9.9. doi:10.1002/0471140864.ps0909s73.

25. Wood 2014, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 26:54-61.

26. Koppel et al. 2001, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49:641-647.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para la detección de un anticuerpo IgM específico para un flavivirus en una muestra, comprendiendo las etapas de
  - (a) poner en contacto la muestra con un soporte sólido que comprende moléculas de unión a IgM inmovilizadas,
  - (b) permitir la unión de anticuerpos IgM en la muestra a las moléculas de unión de IgM en el soporte sólido, de modo que los anticuerpos IgM también se inmovilicen en el soporte sólido, y
  - (c) premezclar un dímero antiparalelo de la Proteína E soluble (sE) de flavivirus con un marcador para la formación de un complejo que comprende el dímero sE y el marcador, en el que el dímero antiparalelo de sE comprende una etiqueta y en el que la etiqueta une el marcador al dímero antiparalelo de sE, y
  - (d) detectar los anticuerpos IgM específicos para un flavivirus permitiendo la unión del complejo preformado

e identificar la unión del complejo al anticuerpo IgM específico para el flavivirus mediante la detección del marcador.
2. Procedimientode acuerdo con la reivindicación 1, en el que las moléculas de unión a IgM son anticuerpos anti-IgM o sus fragmentos de unión a IgM.
3. Procedimientode acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el flavivirus se selecciona del grupo de virus de encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), virus dengue(VD), especialmente VD serotipo 1 (DEN1), VD serotipo 2 (DEN2), VD serotipo 3 (DEN3) y VD serotipo 4 (DEN4) y virus Zika (VZ).
4. Procedimientode acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra es una muestra de suero o plasma, o una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR).
5. Procedimientode acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etiqueta se selecciona de Etiqueta Strep o Etiqueta His.
6. Procedimientode acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el marcador se selecciona de un marcador de afinidad, un marcador de fluorescencia, un marcador radiactivo, un marcador de ácido nucleico, un marcador cromogénico, un marcador de luminiscencia, un marcador magnético o sus combinaciones.
7. Procedimientode acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el complejo comprende un anticuerpo marcado, especialmente un anticuerpo siendo específico para una etiqueta del dímero antiparalelo de sE; una proteína de unión a la etiqueta Strep, especialmente una proteína de unión a la etiqueta Strep que comprende un marcador de acuerdo con la reivindicación 5.
8. Procedimientode acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el soporte sólido es una placa de microtitulación u otros recipientes o superficies de plástico, un microchip biológico, una perla, un disco, una partícula magnética, un sensor de fibra óptica, un portaobjetos de vidrio o una membrana, preferentemente una membrana de nitrocelulosa, una membrana de politetrafluoroetileno, una membrana de acetato de celulosa o una membrana de nitrato de celulosa.
9. Procedimientode acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la detección del marcador comprende la adición de sustancias adicionales generando así una señal o activando el marcador para provocar una señal y medir la señal.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que sE de un flavivirus relacionado de forma distante con los flavivirus patógenos humanos importantes, preferentemente sE de los virus Rio Bravo, Modoc, Yokose, del murciélago Entebb, Barkedji o Lammi, especialmente sE de Rio Bravo, se aplica como un control.
11. Procedimientode acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el procedimiento se realiza en un sistema automatizado.
12. Uso de un kit que comprende:
  - un soporte sólido que comprende moléculas de unión a IgM inmovilizadas y
  - un complejo que comprende
    - (i) un dímero antiparalelo de la proteína E de flavivirus soluble (sE) y

(ii) un marcador, en el que el dímero antiparalelo de sE comprende una etiqueta y en el que la etiqueta une el marcador al dímero antiparalelo de sE, para realizar el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

5 **13.** Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el kit comprende además medios para detectar el marcador, preferentemente medios para detectar un marcador de afinidad, un marcador de fluorescencia, un marcador radioactivo, un marcador cromogénico, un marcador de luminiscencia o un marcador magnético.

10 **14.** Uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que el kit comprende además un sistema de detección automatizado, que comprende preferentemente un dispositivo de transporte de muestras, un dispositivo de detección, una unidad de procesamiento de ordenador y/o una pantalla para mostrar la señal de la unidad de detección procesada por programas de software de ordenador ejecutados con la unidad de procesamiento de ordenador.

15 **15.** Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que al menos el soporte sólido y/o el complejo están empaquetados en una envoltura estéril, preferentemente en una envoltura de plástico transparente estéril.

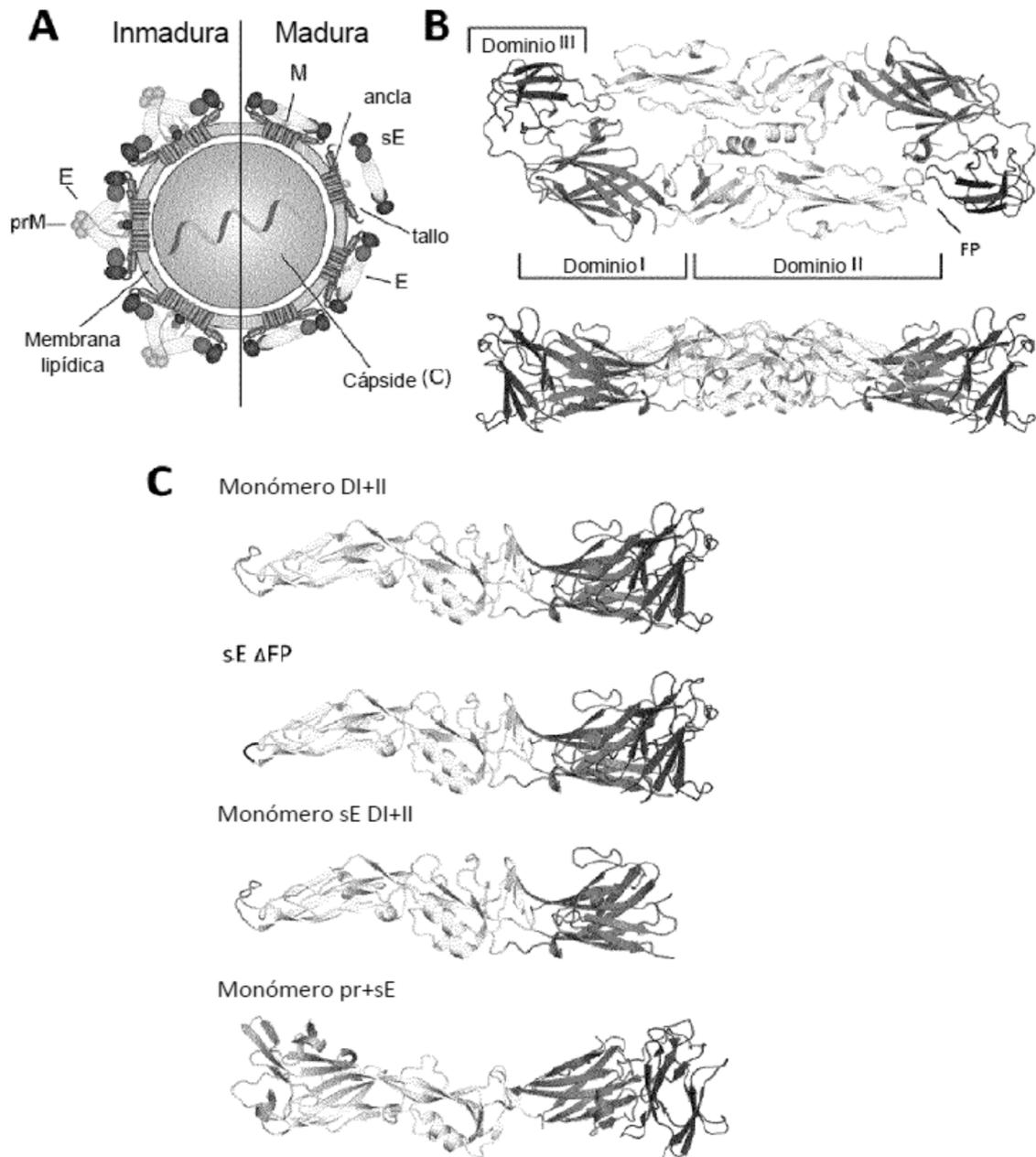


Fig. 1

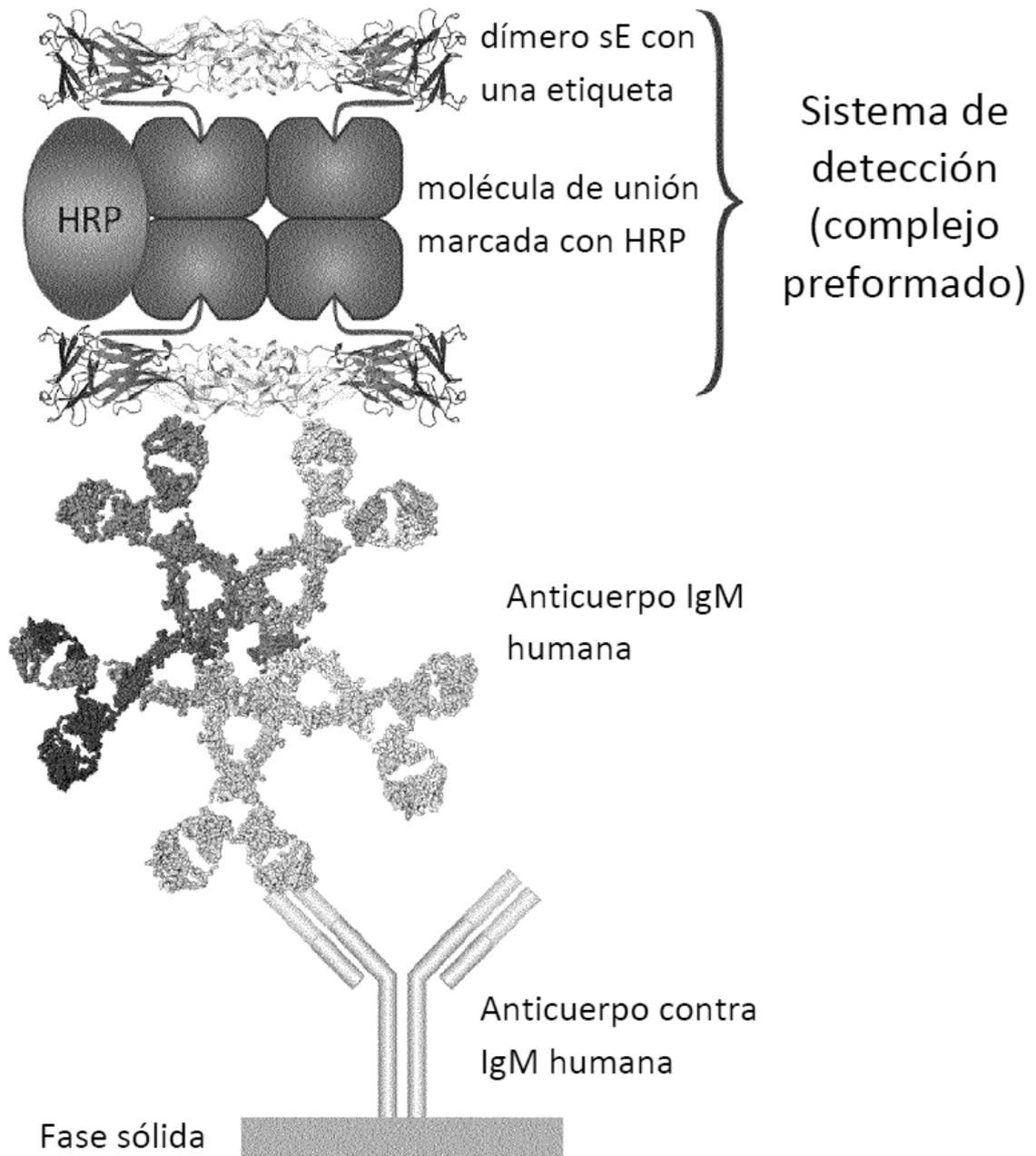


Fig. 2

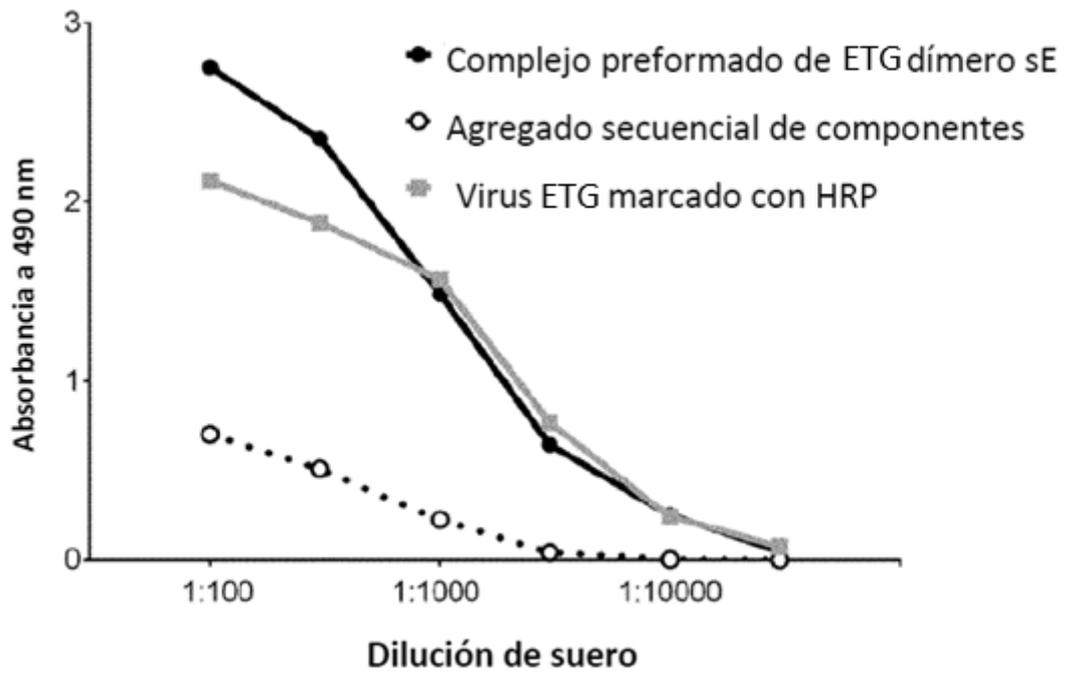


Fig. 3

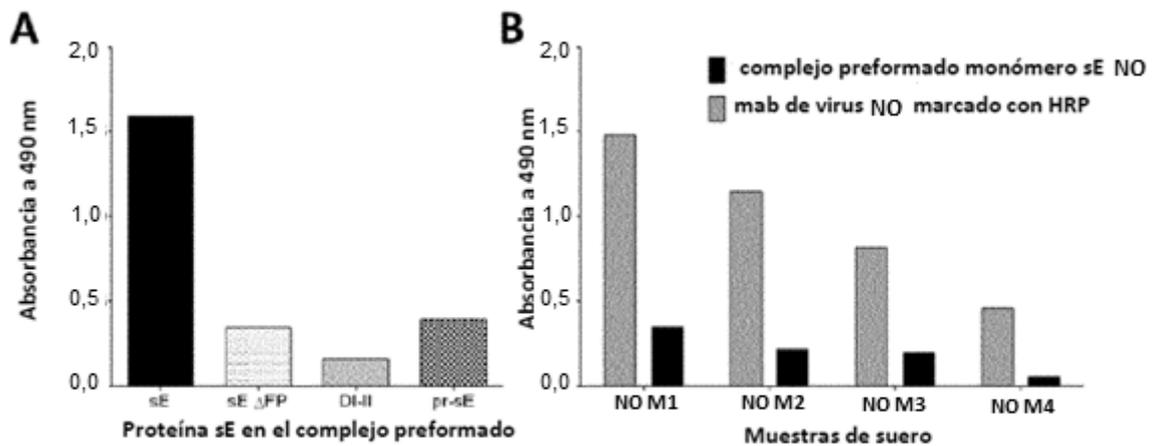


Fig. 4

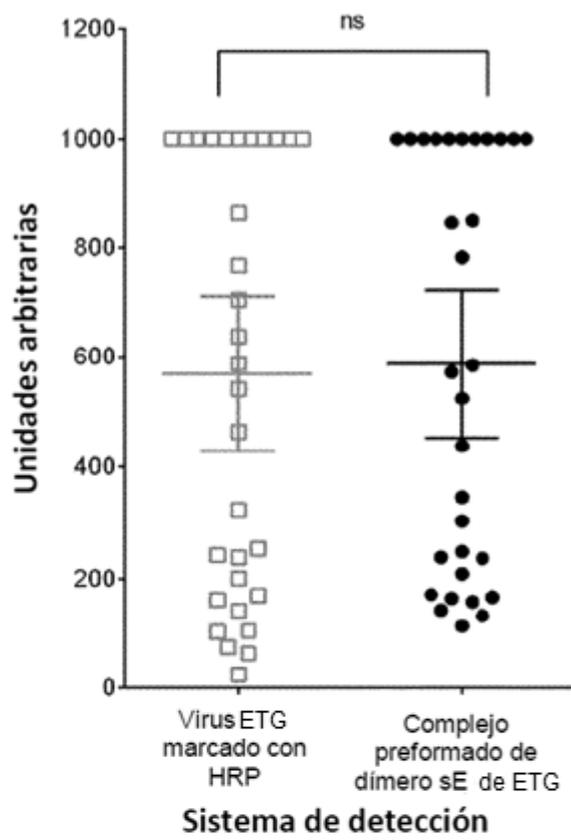


Fig. 5

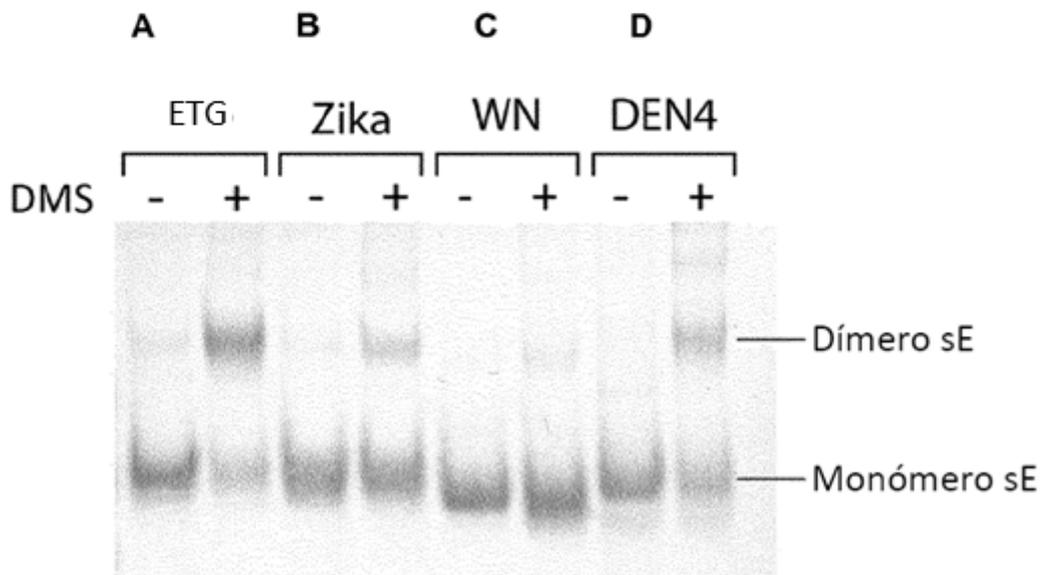


Fig. 6

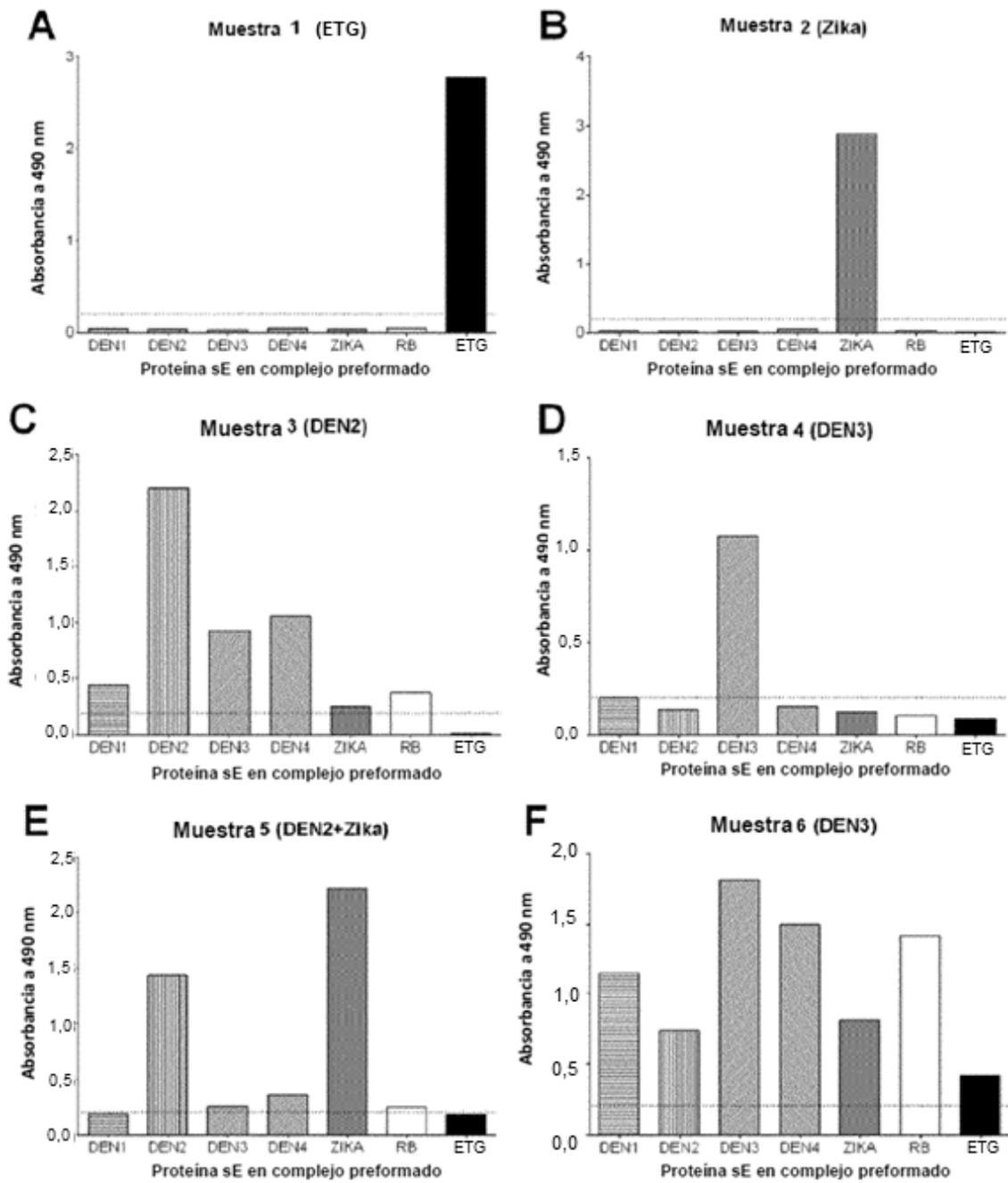


Fig. 7

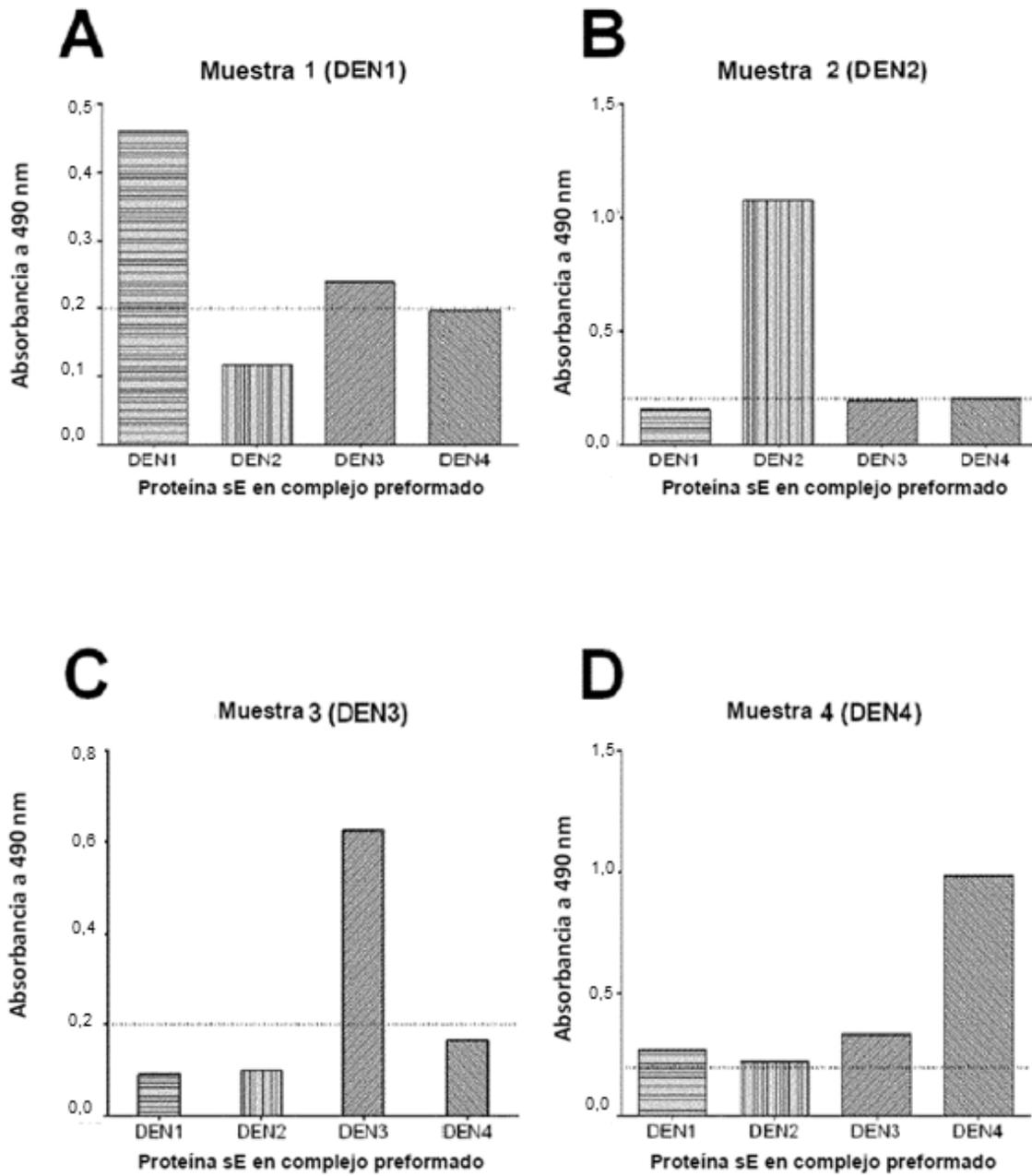


Fig. 8

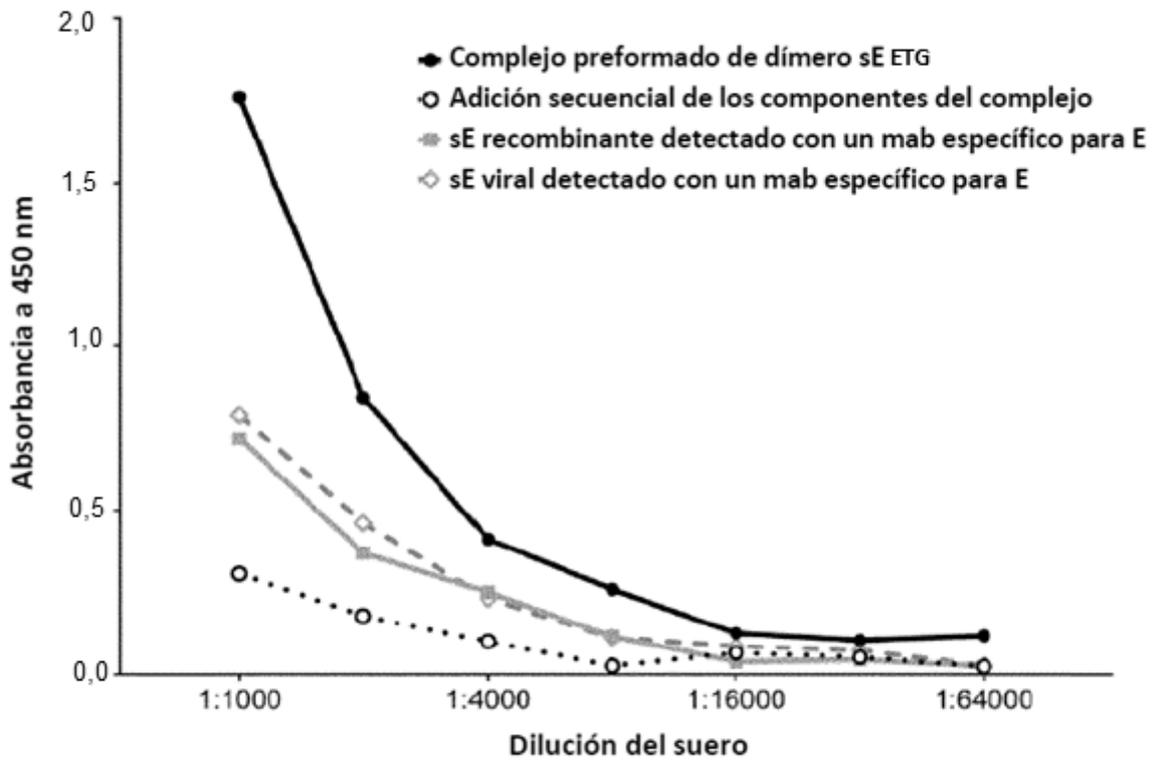


Fig. 9