

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 623**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10173342 .6**
96 Fecha de presentación: **24.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **2267452**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2010**

54 Título: **Complejo soluble que contiene una glicoproteína de superficie retroviral**

30 Prioridad:
22.06.2001 EP 01115225
31.08.2001 EP 01120939

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2012

73 Titular/es:
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:
SCHOLZ, CHRISTIAN;
ANDRES, HERBERT;
ENGEL, ALFRED;
FAATZ, ELKE y
SIZMANN, DOROTHEA

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 391 623 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

Complejo soluble que contiene una glicoproteína de superficie retroviral

5 La presente invención se refiere al diagnóstico de infecciones por VIH. Específicamente describe la producción de un complejo soluble de glicoproteína de superficie (o glicoproteína transmembrana) retroviral-chaperona, y la utilización ventajosa de un complejo chaperona-antígeno, especialmente en la detección de anticuerpos VIH en inmunoensayos, preferentemente, según el concepto de puente de doble antígeno. La invención da a conocer también complejos solubles que comprenden una variante de VIH-1 gp41 o una variante de VIH-2 gp36, respectivamente, y una chaperona (acompañante) seleccionado del grupo que consiste en SlyD y FkpA. También se describen variantes que comprenden sustituciones de aminoácidos específicos del dominio N-helicoidal de VIH-1 gp41 o de VIH-2 gp36, respectivamente.

15 Antecedentes

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida, denominado habitualmente por su acrónimo SIDA. Existen dos cepas principales del virus, denominadas VIH-1 y VIH-2. El virus de la IH se halla en la actualidad ampliamente diseminado y constituye una amenaza grave contra la salud y bienestar en todo el mundo, obliga a los sistemas de atención sanitaria públicos a gastar grandes sumas de dinero en el diagnóstico del VIH y el tratamiento del SIDA.

Una de las vías de diseminación del virus es la transfusión de sangre o derivados sanguíneos infectados. Prácticamente todos los países industrializados, así como muchos países en vías de desarrollo, requieren actualmente de forma obligatoria el análisis de todas las donaciones de sangre para evitar una mayor diseminación del virus. Es tarea de todos los métodos diagnósticos en este campo diagnosticar la infección por VIH de la sangre de forma lo más fiable y temprana posible después de la infección.

Básicamente, se dispone de tres modos de diagnóstico diferentes:

- 30 (1) diagnóstico de material genómico viral en sangre mediante procedimientos de diagnóstico de ácidos nucleicos sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR),
- (2) detección de antígenos virales en sangre, y
- (3) detección de anticuerpos contra el VIH en fluidos corporales.

35 Durante el curso de la infección por el VIH, se conocen varias fases diagnósticas distintas y relevantes. En una fase temprana de la infección solamente se hallaron proteínas y péptidos derivados del virus de la IH (fase virémica), no detectándose todavía anticuerpos anti-VIH. En la fase siguiente, que se denomina seroconversión, aparecen anticuerpos contra el VIH, disminuyendo la cantidad de antígenos virales (carga viral). La mayoría de los anticuerpos formados en la fase inicial de la seroconversión pertenecen a la clase M (IgM) de las inmunoglobulinas. Más tarde, la respuesta inmune contra el VIH cambia a las inmunoglobulinas de la clase G (IgG), que constituyen entonces la mayoría de los anticuerpos dirigidos contra el VIH. Durante la evolución ulterior de la infección, el nivel de anticuerpos anti-VIH puede disminuir mientras que la carga viral (la presencia de partículas virales o antígenos virales) en los fluidos corporales puede aumentar de nuevo. El cribado de la presencia de infección por VIH se realiza preferentemente mediante ensayos serológicos que detectan anticuerpos contra antígenos del VIH, en ocasiones combinados con la detección del antígeno VIH. Dado que la respuesta inmune en un paciente concreto cambia durante el curso de la infección y también varía de una paciente a otro, es importante poseer inmunoensayos extremadamente sensibles y fiables que detecten anticuerpos anti-VIH pertenecientes a las subclases IgM e IgG. Se han descrito diversos enfoques diferentes para la detección de la infección por VIH. Es crucial y de mayor importancia la detección precoz, fiable y sensible de anticuerpos contra las proteínas virales.

50 Las proteínas virales, que frecuentemente se denominan antígenos virales, pueden ser detectables solamente en el momento de producirse la infección y en etapas muy tardías de la enfermedad. Por tanto, los ensayos para la detección de antígenos virales, como los ensayos que miden p24 (para el VIH-1) o p26 (para el VIH-2), que son proteínas virales del núcleo, solamente pueden utilizarse en combinación con otros medios diagnósticos para detectar de forma fiable la infección por VIH.

55 Teóricamente se dispone de tres grupos de antígenos virales, que pueden inducir la formación de anticuerpos en el huésped, y que por lo tanto, pueden utilizarse como antígenos en los procedimientos diagnósticos. Estos son las proteínas de la envoltura viral (codificadas por la región génica *env*), enzimas virales o proteínas reguladoras tales como la transcriptasa inversa o la integrasa (codificadas por la región génica *pol*) y proteínas estructurales del núcleo (codificadas por la región génica *gag*). Las proteínas de la envoltura viral son tanto en el VIH-1 como en el VIH-2 glicoproteínas que se sintetizan como polipéptidos precursores de las proteínas (gp 160 para VIH y gp 140 para VIH-2). Estos precursores de alto peso molecular, tras su síntesis, son escindidos respectivamente en gp120 y gp41 (VIH-1) o gp110 y gp36 (VIH-2). Los polipéptidos más grandes (gp120 o gp110, respectivamente) forman una subunidad de superficie que se asocia a polipéptidos más pequeños que abarcan la membrana (gp41 y gp36, respectivamente) a través de contactos holgados. En muchos huéspedes (pacientes), las proteínas de la envoltura son las dianas preferentes de la respuesta inmune anti-viral. Ratner, L., y otros, Nature 313 (1985) 277-84, han

demostrado que especialmente las proteínas que abarcan la membrana de estas proteínas de la envoltura, es decir, gp41 o gp36, respectivamente, poseen el mayor potencial inmunogénico entre estas proteínas virales.

Los métodos de inmunoensayo, tales como, por ejemplo, el ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), que utilizan polipéptidos codificados por el virus de la IH, se han utilizado ampliamente en el diagnóstico y cribado. Los polipéptidos virales se preparan bien directamente, o se derivan a partir de sistemas de expresión in vitro o in vivo utilizando tecnología de ADN recombinante. Ambos modos de producción de antígenos presentan limitaciones importantes. Los polipéptidos derivados a partir de preparaciones virales pueden estar contaminados con virus viables o material genético infeccioso, suponiendo, por tanto, un riesgo para el personal que utiliza el material. El material derivado de forma recombinante puede estar contaminado por proteínas no VIH del huésped, lo que puede dar lugar a una reducción de la especificidad o especificidad de dichos ensayos.

En la detección de anticuerpos contra agentes patógenos, tal como los patógenos virales, se utilizan muy frecuentemente y de forma muy ventajosa sistemas de detección de anticuerpos, según el formato del puente de doble antígeno, descrito por ejemplo en US 4.945.042. Los inmunoensayos, según este concepto de puente, requieren la utilización de un antígeno unido directa o indirectamente a una fase sólida y la utilización de este mismo antígeno o de un antígeno con reactividad cruzada fácilmente soluble, detectable directa o indirectamente. Los anticuerpos que se investigan, si están presentes, forman un puente entre el antígeno unido a la fase sólida y el antígeno de detección marcado. Solamente si los dos antígenos quedan unidos mediante anticuerpos específicos se genera una señal positiva.

Se han descrito diversos intentos de utilización de gp41 producida de forma recombinante como antígeno para la detección de anticuerpos anti-VIH. La gp41 producida de forma recombinante, con algunas limitaciones, puede utilizarse para detectar anticuerpos anti-VIH. Esta gp41 se utiliza o bien sola o en combinación con otros antígenos VIH para medir los anticuerpos anti-VIH. Actualmente, se conocen ensayos que se dirigen de forma independiente a la detección de antígenos VIH y/o anticuerpos anti-VIH. En WO 93/21346 se describe un ensayo combinado para la detección simultánea del antígeno gp24 y los anticuerpos contra gp41 de VIH-1 y gp36 de VIH-2. En este ensayo, se utiliza una fase sólida la cual se recubre directamente con gp41 producida de forma recombinante.

También está bien establecido que la utilización de valores de pH extraordinariamente altos o bajos es un modo de mantener gp41 (o gp36) en solución. Se sabe que la gp41 producida de forma recombinante es soluble a un pH de alrededor o inferior a 3,0 y a un pH superior a 11,0.

Desafortunadamente, sin embargo, tanto la gp41 de VIH-1 como la gp36 de VIH-2, son, respectivamente, esencialmente insolubles bajo condiciones de tampón fisiológicas.

Los inmunoensayos se llevan a cabo en general a pH fisiológico. Debido a su insolubilidad bajo condiciones de tampón fisiológicas, en varios inmunoensayos los antígenos glicoproteína de la superficie retroviral se utilizan recubiertos directamente sobre un material de fase sólida. Sin embargo, el recubrimiento directo de antígenos sobre materiales de fase sólida es en muchos casos perjudicial y provoca desventajas como cambios conformacionales, desplegamiento molecular, cambios en la antigenicidad, inestabilidad y problemas de fondo (véase Butler, J. E., y otros, J. Immunol. Methods 150 (1992) 77-90).

Aunque es posible solubilizar una glicoproteína de superficie retroviral (rsgp) mediante reactivos caotrópicos fuertes o detergentes adecuados, el material solubilizado de dicho modo tiene un uso limitado como herramienta diagnóstica.

La insolubilidad de las glicoproteínas de superficie retroviral en condiciones de tampón fisiológicas hace además que estas proteínas sean una diana difícil de los procedimientos químicos y (bio)químicos rutinarios. La gran mayoría de "químicas de marcaje", es decir, procedimientos químicos utilizados para unir un marcador, por ejemplo, un grupo marcador de un polipéptido, se basa en química nucleofílica y, por lo tanto, está bastante restringida a una ventana de pH entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 8 y, por lo tanto, solamente funciona a más o menos condiciones de tampón fisiológicas. Estos procedimientos, por ejemplo como se describen en Aslam, M. y Dent, A., The preparation of protein-protein conjugates (La preparación de conjugados proteína-proteína) en "Bioconjugation" ("Bioconjugación") (1998) 216-363, Eds. M. Aslam y A. Dent, McMillan Reference, Londres, o bien no funcionan adecuadamente o son difíciles de llevar a cabo en valores extremos de pH (o en la presencia de detergentes como el SDS) necesarios para solubilizar una glicoproteína de superficie retroviral.

Tal como se ha mencionado anteriormente, los inmunoensayos, según el concepto de puente, se han demostrado ventajosos en una amplia variedad de ensayos diferentes dirigidos a la detección de anticuerpos reactivos con organismos patógenos. Sin embargo, debido a su insolubilidad, no ha sido, por ejemplo, posible utilizar la molécula e-gp41 (es decir, el "ectodominio de la glicoproteína 41") de VIH-1 o e-gp36, respectivamente, en este tipo de ensayo.

Para compensar las desventajas del recubrimiento directo, se han diseñado diversos ensayos, los cuales en lugar de utilizar el antígeno e-gp41, utilizan secuencias parciales del mismo producidas de forma sintética o recombinante,

que abarcan más o menos la región inmunodominante denominada región del bucle. En la literatura de patente comentada más adelante se dan ejemplos de dichos ensayos.

5 La región del bucle en la parte extracelular de gp41 es la horquilla apical no helicoidal de la molécula que une el dominio helicoidal N terminal con el dominio helicoidal C-terminal similar. Una parte significativa de los antisueros reactivos contra gp41 comprende anticuerpos contra la secuencia de bucle apical. Por lo tanto, esta horquilla con puentes disulfuro o estructura en bucle representa una región inmunodominante de gp41. Una forma de superar los problemas asociados con la gp41 obtenida de forma recombinante es, por lo tanto, la producción química de péptidos que representan secuencias parciales de gp41. Es importante tener en cuenta que gp41 o gp36, respectivamente, tal como se denominan en la presente invención, se definen como el denominado ectodominio que comprende las hélices N- y C- conectadas por el bucle, pero que carece del péptido de fusión N-terminal y el segmento de transmembrana C-terminal.

15 En la literatura de patente relevante se dan a conocer fragmentos de péptido de una serie de antígenos VIH (Solicitud de patente australiana nº 597884 (57733/86), y en las patentes U.S. nº 4735896 y nº 4879212). En particular, estas tres especificaciones dan a conocer una región inmunodominante conservada de la glicoproteína gp41, la región bucle de la principal proteína de la envoltura de VIH-1. También se ha sintetizado una región inmunodominante análoga de la proteína gp36 del VIH-2. Los péptidos correspondientes a estas regiones bucle, que forman el ápex del ectodominio, permiten un diagnóstico precoz de VIH-1 y VIH-2 y dan lugar a ensayos con una sensibilidad suficiente pero no óptima y una buena sensibilidad. Sin embargo, sus limitaciones se hacen evidentes respecto a la detección de anticuerpos IgM durante los primeros días de la seroconversión en algunos pacientes.

25 El documento WO 92/22573 da a conocer péptidos que poseen propiedades inmunológicas comunes con el esqueleto, es decir, con una región inmunodominante de las proteínas de envoltura transmembrana (por ejemplo gp41 o gp36) de diversos virus de la inmunodeficiencia de mamíferos. Ello confirma adicionalmente que esta región inmunodominante comprende un bucle disulfuro altamente conservado en las preparaciones de virus de la inmunodeficiencia derivadas de especies de mamífero diferentes.

30 El documento EP 396 559 se refiere a péptidos artificiales que contienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos natural de un VIH. De nuevo los epítomos se derivan a partir de secuencias correspondientes a la estructura de bucle de gp41 o gp36, respectivamente. Se han refinado de forma adicional para contener un puente disulfuro formado por una etapa de oxidación química entre dos residuos cisteína del bucle inmunodominante.

35 Sin embargo, un porcentaje bastante significativo de los anticuerpos contenidos en el antisuero anti-VIH de pacientes infectados por VIH, no reacciona con la secuencia derivada del bucle inmunodominante de gp41 o gp36 o sus variantes. Mientras que estos antígenos peptídicos se pueden utilizar en combinación con el concepto ventajoso del puente, no se detectan anticuerpos reactivos contra epítomos fuera de la región de bucle del gp41 de VIH. No solamente es crucial el diagnóstico muy temprano de una infección por VIH, sino también es extremadamente importante que se detecten tantos subtipos de VIH-1 y VIH-2 como sea posible. Cuantos más epítomos, especialmente epítomos con un plegamiento conformacional correcto de un rsgp, estén presentes, menos probable es no detectar una muestra infectada debido a un diagnóstico falso negativo.

45 Por lo tanto, se han realizado esfuerzos continuos para proporcionar partes más grandes de una glicoproteína de superficie retroviral, especialmente gp41 de VIH-1, en forma soluble.

50 En los últimos años se han estudiado las propiedades biofísicas y bioquímicas de gp41. Lu, M., y otros, Nat. Struct. Biol. 2 (1995) 1075-82) han dilucidado parcialmente la estructura trimérica de gp41. Dado que bajo condiciones fisiológicas gp41 se forma un agregado insoluble, las investigaciones se confinaron a versiones truncadas del ectodominio gyp41.

55 Recientemente se ha confirmado mediante espectroscopía RMN (Caffrey, M., y otros, J Biol Chem 275 (2000) 19877-82) que el trímero nativo de gp41 forma un haz de seis hélices que comprende tres hélices centrales N-terminales paralelas a la cuales se empaquetan las hélices C-terminales en orientación anti-paralela.

También se han descrito agregados moleculares altos de gp41. Dichos agregados se forman, muy probablemente, por la interacción de la denominada región bucle apical de gp41.

60 Root, M. J., y otros, Science 291 (2001) 884-8 han desarrollado mediante diseño de proteínas, un inhibidor de la entrada del VIH-1 en las células diana. Este inhibidor comprende tres tramos derivados del dominio helicoidal N-terminal de gp41 y dos tramos del dominio helicoidal C-terminal de esta molécula. Sin embargo, este constructo realizado mediante ingeniería genética carece de varios dominios y varios epítomos antigénicos de la molécula nativa, y especialmente no contiene la denominada secuencia bucle, que se sabe que contiene epítomos particularmente inmunogénicos (citado más arriba).

Por lo tanto, persiste una gran necesidad de dar a conocer tantos epítomos de glicoproteínas de superficie viral como sea posible en forma soluble. Especialmente, existe la necesidad de dar a conocer aquellos antígenos solubles que comprenden gp41 de VIH-1 o gp36 de VIH-2, respectivamente, para su utilización en diversas aplicaciones tanto terapéuticas como diagnósticas.

5 Un objetivo de la presente invención fue investigar si es posible obtener más epítomos de glicoproteínas de superficie viral o incluso las moléculas e-gp41 o e-gp36, respectivamente, en forma soluble.

10 Otro objetivo de la presente invención fue investigar si es posible obtener variantes de gp41 y/o gp36, respectivamente, que sean más fáciles de manejar y/o que, especialmente bajo las condiciones de tampón necesarias para realizar un inmunoensayo o necesarias para la inmunización, sean solubles en forma de un complejo que comprenda la variante y una chaperona de la clase de chaperonas peptidil-prolil-isomerasa.

15 Las chaperonas, que se conocen como "facilitadores del plegamiento" clásicos, son polipéptidos que ayudan al plegamiento y mantenimiento de la integridad estructural de otras proteínas. Poseen la capacidad de promover el plegamiento de un polipéptido tanto *in vivo* como *in vitro*. En general, los facilitadores del plegamiento se subdividen en catalizadores del plegamiento y chaperonas. Los catalizadores del plegamiento aceleran la velocidad de las etapas limitantes del plegamiento de proteínas gracias a su función catalítica. Más adelante se describen en mayor detalle ejemplos de catalizadores. Las chaperonas se sabe que se unen a polipéptidos desnaturalizados o parcialmente desnaturalizados y de este modo facilitan la renaturalización de proteínas. Por lo tanto, al contrario que los catalizadores, las chaperonas ejercen una mera función de unión (Buchner, J., *Faseb J* 10 (1996) 10-19).

25 Las chaperonas son proteínas ubicuas inducidas por estrés involucradas en la maduración, plegamiento, translocación y degradación de proteínas (Gething, M. J. y Sambrook, J., *Nature* 355 (1992) 33-45). Aunque también se hallan presentes bajo condiciones de crecimiento normales, son inducidas de forma abundante bajo condiciones de estrés. Ello sustenta adicionalmente la idea de que su función fisiológica es hacer frente a condiciones de estrés.

30 Hasta la fecha, se conocen varias familias diferentes de chaperonas. Todas estas chaperonas se caracterizan por su capacidad para unirse a proteínas desplegadas o parcialmente desplegadas y por poseer una función fisiológica relacionada con el plegamiento correcto de las proteínas o la eliminación de proteínas desnaturalizadas o agregadas.

35 Son ejemplos bien caracterizados de chaperonas los miembros de las denominadas familias de proteínas de choque térmico, que se denominan según su peso molecular relativo; por ejemplo, hsp100, hsp90, hsp70, y hsp60, así como las denominadas shsp (proteínas de choque térmico pequeñas) tal como describen Buchner, J., *Faseb J* 10 (1996) 10-19 y Beissinger, M. Buchner, J., *Biol. Chem.* 379 (1998) 245-59.

40 Los catalizadores del plegamiento, al contrario que las chaperonas, contribuyen al plegamiento acelerando por etapas limitantes de la velocidad definidas, reduciendo de este modo la concentración de intermediarios del plegamiento tendentes a la agregación. Una clase de catalizadores, la proteína disulfuro isomerasas (alternativamente denominadas como tiol-disulfuro-óxido-reductasas) cataliza la formación o reordenamiento de los enlaces disulfuro de proteína secretoras. En bacterias Gram-negativas, el plegamiento oxidativo de proteínas secretoras en el periplasma se ajusta mediante una cascada de proteína disulfuro isomerasas denominada DsbA, DsbB, DsbC, y DsbD (Bardwell, J. C., *Mol Microbiol* 14 (1994) 199-205 y Missiakas, D., y otros., *Embo J* 14 (1995) 3415-24).

50 Otra clase importante de catalizadores del plegamiento denominado peptidil prolil cis/trans isomerasas (PPI) comprende diferentes miembros tales como CypA, PpiD (Dartigalongue, C. y Raina, S., *Embo J* 17 (1998) 3968-80), FkpA (Danese, P. N., y otros, *Genes Dev* 9 (1995) 387-98), factor "disparador" (Crooke, E. y Wickner, W., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 5216-20 y Stöller, G., y otros, *Embo J* 14 (1995) 4939-48), y Sly D (Hottenrott, S., y otros, *J Biol Chem* 272 (1997) 15697-701). Entre estos, se ha observado que FkpA, SlyD y el "factor disparador" están relacionados en base a los alineamientos de sus secuencias.

55 La peptidil-prolil-isomerasa FkpA se ha localizado en el periplasma de las bacterias Gram- negativas. Se ha especulado que esta chaperona es importante para el transporte y translocación de las proteínas de la membrana externa bacteriana. Ramm, K. y Pluckthun, A., *J Biol Chem* 275 (2000) 17106-13) han demostrado que FkpA muestra su efecto beneficioso sobre el plegamiento correcto de las proteínas de dos modos diferentes. En primer lugar, FkpA interactúa con intermediarios iniciales del plegamiento, evitando de este modo su agregación. En segundo lugar, posee la capacidad de reactivar proteínas inactivas, posiblemente uniéndose también a moléculas parcialmente desplegadas que puedan existir con la forma agregada.

65 Algunos facilitadores del plegamiento comprenden tanto un dominio catalíticamente activo como un dominio chaperona (o de unión a proteínas). Son ejemplos representativos, por ejemplo, el "factor disparador" (Zarnt, T., y otros, *J Mol Biol* 271 (1997) 827-37), Wang, C. C. y Tsou, C. L., *Faseb J* 7 (1993) 1515-7), SurA (Behrens y otros, *EMBO J.* (2001) 20(1), 285-294), y DsbA (Frech, C., y otros, *Embo J* 15 (1996) 392-98). Según nuestras observaciones, parece existir la misma estructura molecular en las PPIasas FkpA y SlyD, respectivamente.

Se ha demostrado en sistemas independientes diferentes que un incremento en la expresión de chaperonas puede facilitar la producción recombinante de un polipéptido. Puede hallarse un ejemplo de ello en WO 94/08012.

5 También es sabido que puede conseguirse un incremento en la producción de proteínas utilizando un constructo genético que comprenda una secuencia codificadora de un polipéptido, así como una secuencia chaperona. Se ha demostrado que este concepto de fusión, por ejemplo, da lugar a un incremento significativo en la producción de proinsulina humana en el periplasma de *Escherichia Coli* utilizando un constructo genético que comprende el gen de la proinsulina humana y DsbA (Winter, J., y otros, Journal of Biotechnology 84 (2000) 175-185).

10 La estrategia de utilizar chaperonas para incrementar la producción de polipéptidos con un plegamiento similar a los nativos es debido principalmente a la unión y, por lo tanto, la función solubilizadora de las proteínas chaperona. Tras la producción recombinante de una polipéptido de fusión que comprende la chaperona y la proteína diana, habitualmente se escinden las chaperonas del polipéptido resultante dando lugar al polipéptido deseado en forma pura. Por el contrario, la presente invención se basa en el efecto solubilizante beneficioso de una chaperona adecuada mientras está asociada a una glicoproteína de superficie retroviral.

20 De forma sorprendente, observamos que facilitadores del plegamiento, por ejemplo muchos miembros de la clase peptidil-prolil-isomerasa (PPI), especialmente de la familia FKBP, no sólo muestran actividad catalítica, si no que también traen consigo efectos beneficiosos drásticos sobre la solubilidad de proteínas amiloidogénicas, o de forma más general, de proteína con tendencia a la agregación. Ello lo consiguen formando complejos solubles con dichas proteínas que de otro modo (es decir, en un forma aislada sin chaperonas) son tendentes a la agregación. Estas proteínas que de otro modo son difícilmente solubles o insolubles bajo condiciones fisiológicas, se vuelven solubles bajo condiciones fisiológicas suaves (es decir, sin necesidad de aditivos solubilizantes tales como detergentes o agentes caotrópicos) una vez se unen en un complejo con la chaperona PPI adecuada. De este modo, hemos sido capaces de producir, por ejemplo, complejos proteína-chaperona solubles que comprenden, por ejemplo, la proteína gp41 de VIH-1 como proteína diana tendente a la agregación y FkpA u otras FKBP como chaperonas dotadoras de solubilidad.

30 Además, los inventores han descubierto que ciertas variantes bien definidas de VIH-1 gp41 o de VIH-2 gp36, respectivamente, son especialmente adecuadas para formar un complejo soluble con chaperonas de la clase PPI.

35 Los complejos de gp41 y FkpA o de gp36 y FkpA, por ejemplo, son fácilmente solubles, por ejemplo bajo condiciones fisiológicas, pueden marcarse con facilidad en intervalos de pH convenientes, y pueden utilizarse con grandes ventajas en la detección de anticuerpos contra la gp41 o la gp36, respectivamente, del VIH (1 ó 2, respectivamente) y, por lo tanto, en el diagnóstico de una infección por VIH.

Breve descripción de las figuras

40 Figuras 1A y 1B. Espectros (DC) UV lejano (1A) y cercano (1B) del ectodominio gp41 (535-681) -His₆ del VIH-1

45 Gp41 plegada (línea gruesa): se ajustaron unas condiciones de tampón (formiato sódico 30 mM, pH 3,0) para inducir una conformación totalmente helicoidea similar a la nativa de gp41; gp41 desnaturalizada (línea delgada): se ajustaron unas condiciones de tampón (fosfato sódico 50 mM pH 3,0, GuHCl 7,0 M) para desnaturalizar completamente (desplegar) gp41. Debido a la elevada molaridad de la sal caotrópica, la señal dicroica de referencia de la figura 1A (línea delgada) no pudo controlarse de forma fiable en la región de longitud de onda inferior a 215 nm. Los espectros se registraron en un espectropolarímetro Jasco-720 y se hizo la media de nueve veces para disminuir el ruido de fondo. La longitud del trayecto fue de 0,2 cm para el DC-UV lejano (figura 1A) y de 0,5 cm para el DC-UV cercano (figura 1B). Las concentraciones de proteína fueron 1,5 µM y 29 µM, respectivamente. Las unidades de las ordenadas son la elipticidad residual media y tienen las dimensiones deg x cm² x dmo⁻¹.

50 Figura 2. Agregación de gp41 "sin chaperonas" en tampón fisiológico

55 Se muestran los espectros UV del ectodominio gp41 un minuto (línea inferior) y 10 minutos (línea superior) tras una elevación del pH de 3,0 a 7,5. Las moléculas en agregación conllevan efectos de dispersión de la luz y provocan una absorción aparente por encima de los 310 nm. La figura tiene como objeto solamente demostrar la enorme tendencia a la agregación de gp41; cabe resaltar que el proceso de agregación no se detiene en la etapa indicada por la línea superior.

60 Figuras 3A y 3B. FkpA solubiliza el ectodominio gp41 a pH neutro

65 Se incubaron conjuntamente gp41 y FkpA madura a pH bajo y a continuación se cambió a las condiciones tampón finales consistentes en fosfato sódico 20 mM, pH 7,4; NaCl 50 mM, EDTA 1 mM. Tras 1 y 10 minutos (líneas inferior y superior, respectivamente) se registraron los espectros UV para evaluar el grado de agregación en las muestras. La figura 3A muestra la supresión de la agregación por un exceso molar de dos veces de la chaperona. La figura 3B muestra el efecto de un exceso de cuatro veces. La concentración final de gp41 fue de aproximadamente 1 µM.

Dado que la dispersión de la luz (que conlleva una absorción aparente de la luz por encima de los 300 nm) se redujo al mínimo, existe una evidencia convincente mediante espectroscopía de que FkpA solubiliza de forma eficiente el ectodominio gp41 de forma dependiente de la dosis.

5 Figura 4. Espectro UV de FkpA-gp41 a pH 2,5

Espectro UV del polipéptido de fusión FkpA-gp41 tras diálisis frente fosfato sódico 50 mM, pH 2,5; NaCl 50 mM. Sorprendentemente, el constructo de dos dominios continúa siendo completamente soluble tras eliminar el agente caotrópico solubilizante GuHCl. No se observan evidencias de la existencia de agregados dispersores de la luz que se esperaría que provocaran un desvío de la línea de base y una absorción aparente significativa a longitudes de onda por encima de los 300 nm.

15 Figura 5. Espectro DC-UV cercano de FkpA-gp41 a pH 2,5

Se registró el espectro en un espectropolarímetro Jasco 720 en fosfato sódico 20 mM, pH 2,5; NaCl 50 mM a 20°C y se acumuló nueve veces para disminuir el ruido de fondo. La concentración de proteína fue de 22,5 µM a una longitud de trayecto de 0,5 cm. La elipticidad aromática muestra la huella típica de gp41 (como referencia ver figura 1B). A pH 2,5, FkpA se encuentra en gran medida desestructurada y no contribuye en absoluto a la huella en el DC UV cercano.

20 Figura 6. Espectro DC-UV lejano de FkpA-gp41 a pH 2,5

Se registró el espectro en un espectropolarímetro Jasco 720 en fosfato sódico 20 mM, pH 2,5; NaCl 50 mM a 20°C y se acumuló nueve veces para mejorar la relación entre señal y ruido de fondo. La concentración de proteína fue de 2,25 µM a una longitud de trayecto de 0,2 cm. Los valores mínimos a 220 y 208 nm apunta a una estructura de gp41 globalmente helicoidal en el contexto de la proteína de fusión. El ruido espectral por debajo de 197 nm es debido a la elevada absorción de la amida y no informa de ninguna característica estructural de la proteína de fusión. Sin embargo, puede intuirse el típico máximo de hélice a 193 nm.

25 Figura 7. Espectro DC-UV cercano de FkpA-gp41 bajo condiciones de tampón fisiológicas

Se registró el espectro en un espectropolarímetro Jasco 720 en fosfato sódico 20 mM, pH 7,4; NaCl 50 mM a 20°C y se acumuló nueve veces para disminuir el ruido de fondo. La concentración de proteína fue de 15,5 µM a una longitud de trayecto de 0,5 cm. Sorprendentemente, la elipticidad aromática de los dominios de la proteína gp41 y FkpA unidos de forma covalente (línea continua) se forma aditivamente a partir de la contribución de la gp41 totalmente helicoidal similar a la nativa a pH 3,0 (línea de puntos inferior) y de FkpA a pH 7,4 (línea de puntos superior). Ello indica que el portador FkpA y la diana gp41 (es decir, dos unidades de plegamiento funcionales diferentes) repliegan reversiblemente y de forma casi independiente cuando se unen en una proteína de fusión de polipéptidos.

30 Figura 8. Espectro DC-UV lejano de FkpA-gp41 bajo condiciones de tampón fisiológicas

Se registró el espectro en un espectropolarímetro Jasco 720 en fosfato sódico 20 mM, pH 7,4; NaCl 50 mM a 20°C y se acumuló nueve veces para mejorar la relación entre señal y ruido de fondo. La concentración de proteína fue de 1,55 µM a una longitud de trayecto de 0,2 cm. Las intensas señales a 222 nm y 208 nm apuntan, respectivamente, a una estructura globalmente helicoidal de gp41 en el contexto del constructo de fusión. El ruido de fondo por debajo de 198 nm es debido a la elevada absorción de proteínas y no refleja ninguna propiedad estructural secundaria de FkpA-gp41.

35 Figura 9. Gp41 unida a FkpA es tanto soluble como altamente inmunoreactiva en un ensayo VIH

FkpA-gp41 es un competidor potente en el ensayo COBAS CORE HIV Combi. Se muestra el potencial inhibidor del polipéptido FkpA-gp41 soluble (círculos llenos) tras tratamiento previo con tampón de dilución (que contiene Triton X-100 como detergente coadyuvante) en comparación con el ectodominio gp41 solo (círculos vacíos). Es evidente que el ectodominio gp41 (dentro del complejo intramolecular de la proteína de fusión) retiene su elevada inmunoreactividad incluso en presencia de detergente, mientras que el ectodominio desnudo pierde casi completamente la inmunoreactividad. El suero positivo para VIH analizado fue el suero interno número 21284 a una dilución 1:3.000.

40 Figura 10. Espectro UV de FF36 tras filtración en gel renaturalizante

El espectro proporciona evidencias convincentes de que el péptido de fusión gp36 es soluble y no se agrega cuando se repliega en una columna Sux 200 según el método de filtración en gel renaturalizante, tal como se describe en la sección de ejemplos.

45 Figura 11 (1 + 2). FkpA-gp21 es un polipéptido de fusión simultáneamente soluble e inmunológicamente reactivo.

Tras filtración en gel renaturalizante, la proteína de fusión FkpA-gp21 replegada se eluye de forma altamente soluble y no muestra tendencia alguna a la agregación en el espectro UV (11/1). Cuando se evalúa en un experimento de inmunoensayo del tipo competitivo en el COBAS CORE con el suero positivo HTLV para VIH 858893-00 (dilución 1:10), FkpA-gp21 resulta que posee propiedades inmunológicas excelentes (11/2).

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un inmunoensayo según el concepto de puente de doble antígeno, comprendiendo un primer antígeno que comprende un primer complejo chaperona-antígeno y un segundo antígeno que comprende un segundo complejo chaperona-antígeno, de manera que dicho antígeno es una proteína amiloidogénica y en el que dicha chaperona es seleccionado del grupo que consiste en SlyD y FkpA.

El primer y segundo complejos de chaperona y antígeno, utilizados en un inmunoensayo según la presente invención, puede ser previsto por un método, tal como se describe más adelante para la producción de un complejo soluble que comprende una proteína diana que esencialmente insoluble y una chaperona de clase peptidil-prolil-isomerasa que comprende la mezcla de dicha proteína y dicha chaperona en un tampón, de manera que, tanto la proteína como la chaperona son solubilizadas y ajustando el tampón a condiciones fisiológicas, de manera que el complejo formado, proteína-chaperona, es soluble.

Una "proteína diana", según la presente invención, puede ser cualquier proteína que sea esencialmente insoluble en una solución de tampón acuosa de pH 7,4 formado por fosfato sódico 20 mM y cloruro sódico 150 mM. Son proteínas diana preferentes, por ejemplo, las proteínas amiloidogénicas, las glicoproteínas de superficie de virus amiloidogénicos, glicoproteínas de superficie retrovirales, especialmente gp41 de VIH-1, gp36 de VIH-2 y gp21 HTLV.

Un grupo importante de polipéptidos diana son las denominadas proteínas o polipéptidos amiloidogénicos. Se han hallado dichas proteínas amiloidogénicas en forma agregada en fluidos o compartimientos corporales. Son ejemplos bien conocidos el amiloide A sérico (sAA), el denominado β -A4 o A β (un polipéptido de 42 o 43 aminoácidos que se sabe que forma los característicos depósitos de amiloide de los cerebros con enfermedad de Alzheimer), las denominadas proteínas prión (la forma PrP^{Sc} se acumula en agregados en la BSE o enfermedad de Creutzfeldt-Jacob), y las glicoproteínas de superficie retrovirales, como gp41 de VIH-1, que se encuentran en placas tipo amiloide en el cerebro de pacientes afectados de HAD (demencia asociada al VIH). En una realización preferente, se utiliza una chaperona, preferentemente una chaperona PPI, para formar un complejo soluble que comprende una proteína amiloidogénica y la chaperona. Con grandes ventajas, puede utilizarse un complejo de este tipo en muchos procedimientos de inmunoensayo diferentes. Preferentemente, dicho complejo se utiliza en un inmunoensayos, según el concepto del puente de doble antígeno.

El VIH y otros virus dotados de envoltura, tales como el HTLV, el virus influenza o el virus Ebola, expresan glicoproteínas de superficie que median la unión a células y la fusión con membranas. Para realizar estas funciones, todas estas glicoproteínas de superficie contienen segmentos extremadamente hidrofóbicos que hacen que sean difíciles de manipular *in vitro*, tendentes a la agregación y las convierten en dianas que desafían los intentos de replegado *in vitro*. En otra realización preferente, la presente invención se refiere a un complejo soluble formado por una chaperona PPI y una glicoproteína de superficie de un virus con envoltura. Se refiere especialmente a la utilización de un complejo formado por una chaperona PPI y una glicoproteína de superficie de un virus con envoltura en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra la glicoproteína de superficie.

HAD es una complicación bien conocida de la infección por VIH. Tal como describen Caffey, M. y otros (citado más arriba), con respecto a la fenomenología histológica, HAD es muy similar a la encefalopatía espongiiforme denominada enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. Se considera generalmente que la etiología de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob es debida a la acumulación amiloidogénica de placas formada por una proteína prión modificada (Prusiner, S. B., Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 13363-83). Es muy probable, en el caso de la HAD una patogénesis análoga debida a agregados de alto peso molecular de e-gp41. Cabe resaltar que las lesiones neurológicas de la encefalopatía por VIH comparten características patológicas y radiológicas con la enfermedad de Binswanger.

Las proteínas amiloidogénicas preferentes, según la presente invención, son gp41 derivada de VIH-1, gp36 derivada de VIH-2 o gp21 derivada de HTLV, respectivamente.

Una proteína se considera "esencialmente insoluble" si en un tampón compuesto por fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM es soluble a una concentración de 50 nM o inferior.

Un complejo, según la presente invención, formado por una chaperona-PPI y una proteína diana se considera "soluble" si bajo condiciones de tampón fisiológicas, por ejemplo en un tampón compuesto por fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, la proteína diana incluida en el complejo PPI-chaperona es soluble a una concentración de 100 nM o superior.

Los expertos en la técnica han desarrollado un método que comprende las etapas de mezclar la proteína diana y la chaperona en un tampón en el que tanto la proteína como la chaperona se solubilizan y ajustan el tampón a condiciones fisiológicas en las que el complejo proteína-chaperona formado sigue siendo soluble.

La producción del complejo chaperona-proteína diana soluble parte de una condición de tampón solubilizante, es decir, parte de un tampón en el que tanto la proteína diana como la chaperona son solubles. Un tampón adecuado, que puede denominarse “no fisiológico” o “solubilizante” debe cumplir el requisito de que tanto la proteína diana como la chaperona PPI no se desnaturalicen o al menos no se desnaturalicen de forma irreversible. Partiendo de estas condiciones tampón, la chaperona se une a la proteína diana, siendo entonces posible un cambio de las condiciones de tampón de no fisiológicas a fisiológicas sin que la proteína diana precipite.

Un tampón (no fisiológico) adecuado, es decir un tampón, en el que tanto la proteína diana que es esencialmente insoluble como la chaperona son solubles o bien utiliza un pH alto o bajo, o utiliza una concentración de sal caotrópica elevada o una combinación de ambos.

En el caso de la producción de un complejo intermolecular que comprende una chaperona-PPI y una proteína diana que es esencialmente insoluble el tampón no fisiológico es preferentemente un tampón con un pH bastante alto o bastante bajo. Preferentemente, dicho tampón posee un pH entre 9 y 12 en la gama del pH alto o entre 2 y 4,5 en la gama de pH bajo.

En el caso de la producción de un complejo intramolecular que comprende una chaperona-PPI y una proteína diana, que es esencialmente insoluble, el tampón no fisiológico es preferentemente un tampón con una concentración elevada de sal caotrópica, por ejemplo cloruro de guanidinio 6,0 M a un pH de aproximadamente 6. Al renaturalizarse, la proteína diana asume su estructura similar a la nativa y se forma el complejo intramolecular.

En el contexto de la presente invención, las condiciones de tampón fisiológicas se definen por un valor de pH entre 5,0 y 8,5 y una concentración total de sal inferior a 500 mM, independientemente de otros componentes no salinos que pueden opcionalmente estar presentes en el tampón (por ejemplo azúcares, alcoholes, detergentes) siempre y cuando dichos aditivos no alteren la solubilidad del complejo formado por la proteína diana y la chaperona.

En otra realización preferente, la presente invención se refiere a un método para la producción de un complejo chaperona-glicoproteína de superficie retroviral soluble que comprende: mezclar una glicoproteína de superficie retroviral y una peptidil-prolil-isomerasa en un tampón en el que tanto la glicoproteína de superficie retroviral como la peptidil-prolil-isomerasa se solubilizan y forman un complejo, y ajustar el tampón a condiciones fisiológicas en las que el complejo es soluble.

El término “glicoproteína de superficie viral” o “rsgp” tal como se utiliza en la presente invención, comprende gp41 de VIH-1, gp36 de VIH-2, así como las glicoproteínas de la envoltura correspondientes derivadas de otro virus de la inmunodeficiencia de otros mamíferos. Son glicoproteínas de superficie retroviral preferentes gp41 de VIH-1, gp36 de VIH-2 y gp21 de HTLV. Son rsgps especialmente preferentes gp41 de VIH-1 y gp36 de VIH-2. El término rsgp, tal como se define en la presente invención, también comprende variantes naturales y sintetizadas mediante ingeniería genética de una rsgp.

Se ha descubierto que ciertas sustituciones bien definidas de aminoácidos, dentro del dominio N-helicoidal de gp41 o gp36, respectivamente, aportan otras ventajas en las características globales de estas moléculas en comparación con polipéptidos que tienen una secuencia salvaje de gp41 o gp36, respectivamente. Estas variantes representan una realización preferente, según la presente invención. Especialmente una variante de VIH-1 gp41 que comprende, como mínimo, una sustitución de aminoácido y, como máximo, cuatro sustituciones de aminoácido en una o varias posiciones seleccionadas del grupo de las posiciones Leu 555, Leu 566, Ile 573 y Ile 580, en las que estas posiciones son las posiciones conocidas de la secuencia de tipo salvaje HIV-1 gp41 (SEQ ID N°: 1) o correspondiente a las posiciones conocidas a partir de aquellas, caracterizándose porque el aminoácido de sustitución es seleccionado o, respectivamente e independientemente, son seleccionados del grupo que consiste en serina, treonina, asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico, o una variante de VIH-2 gp36 que comprende, como mínimo, una sustitución de aminoácido y, como máximo, tres sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo de posiciones Leu 554, Leu 565 y Val 579, de manera que estas posiciones son unas posiciones conocidas por la secuencia VIH-2 gp36 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 2), o que corresponden a las posiciones conocidas a partir de la misma, caracterizándose porque el aminoácido de sustitución es o son, respectivamente e independientemente, seleccionados del grupo que consiste en serina, treonina, asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico, siendo apropiado, por lo menos para solucionar parcialmente los problemas conocidos de la técnica.

Las nuevas variantes, respectivamente, gp41 o gp36 tienen menos tendencia a la agregación, son más solubles y más fáciles de manejar en comparación con sus polipéptidos correspondientes de las secuencias de tipo salvaje. La solubilidad mejorada resulta especialmente evidente cuando se intenta conseguir un reactivo que en condiciones de tampón fisiológico comprenda gp41 o gp36 en forma soluble. Se ha mostrado especialmente ventajoso mostrar las

propiedades favorables de las nuevas variantes con los ejemplos facilitados por una chaperona seleccionada entre la clase de chaperonas de peptidil-prolil-isomerasa (PPI). Por lo tanto, la invención se refiere además a la utilización de una variante de gp41 y/o una variante de gp36, tal como se describe en la presente invención para la producción de un complejo soluble que comprende dicha variante y una chaperona de la clase de chaperonas de peptidil-prolil-isomerasa.

Un complejo soluble que comprende una VIH glicoproteína variante y una chaperona de clase PPI se obtiene preferentemente de una única proteína recombinante que comprende, tanto la variante de VIH-1 gp41 o VIH-2 gp36, respectivamente, como una chaperona de clase PPI. Por lo tanto, una realización preferente es una proteína recombinante que comprende una variante de de VIH-1 gp41 o VIH-2 gp36, tal como se describe en la presente invención y una chaperona seleccionada de la clase de chaperonas de peptidil-prolil-isomerasa.

El hecho de que las nuevas variantes de gp41 o gp36 son más fáciles de manipular que los polipéptidos de tipo salvaje las hace ideales para diferentes objetivos, tales como su utilización como inmunógeno o utilización como antígeno. En una realización preferente, la presente invención está dirigida a la utilización de una variante de gp41 y/o gp36, de acuerdo con la presente invención o de un complejo que comprende una chaperona PPI y dicha variante, por ejemplo, como proteína recombinante única, en un inmunoensayo. De modo muy sorprendente, una proteína de fusión que comprende tanto una glicoproteína de superficie retroviral como una chaperona PPI se puede solubilizar y renaturalizar en condiciones apropiadas y se ha descubierto que forma un complejo soluble intramolecular rsgp-chaperona que posibilita el marcado conveniente y la detección fiable en un inmunoensayo de VIH.

El complejo soluble entre una glicoproteína de superficie retroviral y una chaperona puede utilizarse de forma muy ventajosa en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos, según el concepto de puente de doble antígeno.

Un complejo rsgp-chaperona que comprende gp41 de VIH-1 o gp36 de VIH-2 es especialmente ventajoso en la detección de anticuerpos contra el VIH en una fase precoz de la infección. Con un complejo chaperona-gp41 soluble o un complejo chaperona-gp36 soluble, es posible realizar un inmunoensayo, preferentemente según el concepto de puente, que permite una detección precoz y sensible de anticuerpos contra el VIH en una muestra de fluido corporal.

El hecho de que las chaperonas puedan formar complejos con proteína que de otro modo son insolubles, también pueden utilizarse de forma muy ventajosa para mejorar de forma más general los inmunoensayos, preferentemente los inmunoensayos según el concepto de puente. El concepto de puente permite la utilización de un complejo chaperona-antígeno como primer antígeno (principalmente denominado antígeno de captura en el lado de la fase sólida) y de un segundo complejo chaperona-antígeno (principalmente un antígeno de detección en el lado de la detección). Para minimizar los problemas de reacción de fondo provocados por la unión de anticuerpos reactivos frente a chaperonas, dichos ensayos de puente pueden aún modificarse de forma ventajosa utilizando una primera chaperona para el lado de la fase sólida y una segunda chaperona en el lado de la detección derivada de especies diferentes.

Actualmente es posible realizar inmunoensayos, según el concepto de puente, utilizando un complejo chaperona-antígeno marcado. También es posible producir un complejo chaperona-antígeno en el que solamente se marque la chaperona, garantizando que el antígeno no se modifica o se influencia negativamente (por ejemplo, en términos de conformación) por dicho marcaje.

El modo y estrategia de acoplamiento químico puede seleccionarse según sea necesario. En el caso de polipéptidos, están disponibles métodos químicos dirigidos a residuos -SH, -NH₂ o -COO-, así como al grupo -OH de las tirosinas, el grupo imidazol de las histidinas o los grupos imino heterocíclicos de los triptófanos. Para cada uno de dichos grupos funcionales se conocen diversos métodos químicos adecuados (Aslam, M. y Dent, A., citado más arriba). Los métodos químicos de acoplamiento rutinarios requieren que la proteína sea soluble bajo condiciones de tampón de trabajo, por ejemplo en un intervalo de pH entre aproximadamente 5 y 8,5. Como, por ejemplo, gp41 no es soluble en este intervalo de pH a no ser que se desnaturalice, por ejemplo mediante SDS, la gp41 con un plegamiento similar al nativo no ha sido hasta ahora susceptible de acoplamiento químico. Los complejos gp41-chaperona que describimos en la presente invención proporcionan un medio conveniente para la producción de proteínas de la envoltura del VIH marcadas solubles para inmunoensayos independientemente del formato de detección utilizado.

En una realización preferente, la presente invención se refiere al proceso para la producción de un complejo rsgp-chaperona que comprende las etapas de mezclar una glicoproteína de superficie retroviral solubilizada y una chaperona seleccionada de la clase de chaperonas de peptidil-prolil-isomerasa bajo condiciones de tampón no fisiológicas y a continuación ajustar el tampón a condiciones fisiológicas formándose de este modo un complejo intermolecular.

Las chaperonas y glicoproteínas de superficie retroviral pueden no solo utilizarse como polipéptidos separados. Hemos observado sorprendentemente que es ventajoso unir ambas proteínas covalentemente. Dicha unión covalente es posible mediante procedimientos de entrecruzamiento químico convencionales; preferentemente, sin

embargo, la unión covalente se consigue produciendo un polipéptido recombinante que comprende una glicoproteína de superficie retroviral y una chaperona.

5 En otra realización preferente, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de un complejo rsgp-chaperona soluble que comprende las etapas de solubilizar, bajo condiciones de tampón adecuadas, una proteína que comprende, unidas covalentemente, una glicoproteína de superficie retroviral y una proteína chaperona seleccionada de la clase de chaperonas de peptidil-prolil-isomerasa y a continuación ajustar el tampón a condiciones fisiológicas. De este modo, se obtiene un complejo intramolecular.

10 La presente invención enseña la utilización de las chaperonas derivadas de la clase de facilitadores del plegamiento denominados peptidil prolil cis/trans isomerasas (PPIs) (véase Dartigalongue, C. y Raina, citado más arriba). Son ejemplos bien conocidos de esta familia los miembros denominados CypA, PpiD (Dartigalongue, C. y Raina, S., *Embo J* 17 (1998) 3968-80; Schmid, F. X., *Molecular chaperones in the life cycle of proteins* ("Las chaperonas moleculares en el ciclo vital de las proteínas") (1998) 361-389, Eds. A. L. Fink y Y. Goto Marcel Decker In., Nueva York), FkpA (Danese, P. N., y otros, *Genes Dev* 9 (1995) 387-98) y "factor disparador" (Crooke, E. y Wickner, W., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 5216-20; Stoller, G., y otros, *Embo J* 14 (1995) 4939-48).

20 Las peptidil-prolil-isomerasas se subdividen en tres familias, las parvulinas (Schmid, F.X., ver arriba, Rahfeld, J. U., y otros, *FEBS Lett* 352 (1994) 180-4), las ciclofilinas (Fischer, G., y otros, *Nature* 337 (1989) 476-8) y la familia FKBP (Lane, W. S., y otros, *J Protein Chem* 10 (1991) 151-60). La familia FKBP muestra una característica bioquímica interesante dado que sus miembros se han identificado originalmente por su capacidad de unirse a macrólidos, por ejemplo, FK 506 y rapamicina (Kay, J. E., *Biochem J* 314 (1996) 361-85).

25 Las prolil isomerasas pueden comprender diferentes subunidades o módulos de funciones diferentes, por ejemplo un módulo que muestra actividad catalítica y un módulo que muestra la actividad chaperona o de unión. Dichos miembros modulares de la familia FKBP son FkpA (Ramm, K. y Pluckthun, A., *J Biol Chem* 275 (2000) 17106-13), SlyD (Hottenrott, S., y otros, *J Biol Chem* 272 (1997) 15697-701) y el "factor disparador" (Scholz, C., y otros, *Embo J* 16 (1997) 54-8). En una realización preferente, la invención hace referencia a un complejo soluble que comprende una glicoproteína de superficie retroviral y una chaperona seleccionada de la clase de chaperonas de peptidil-prolil-isomerasa de catalizadores de plegamiento.

30 Obviamente, la presente invención no está restringida por la utilización de los miembros mencionados específicamente de la clase peptidil-prolil-isomerasa, sino que también puede realizarse utilizando chaperonas derivadas de la misma clase pero derivado de otras especies de bacterias. Preferentemente se utilizan miembros de la familia FKBP de la clase de chaperonas PPI.

35 En otra realización, es preferente la utilización de homólogos derivados de organismos eucariotas y es muy preferente la utilización PPIasas de origen humano porque estas PPIasas no deberían ser reconocidas por anticuerpos derivados de sueros humanos y, por lo tanto, no deberían interferir en los ensayos serológicos (es decir, en ensayos basados en la detección de anticuerpos humanos).

40 También es conocido y apreciado que no es necesario utilizar siempre la secuencia completa de una chaperona molecular, También pueden utilizarse fragmentos funcionales de chaperonas (los denominados módulos) que siguen poseyendo las capacidades y funciones requeridas (véase WO 98/13496).

45 Por ejemplo, FkpA es una PPI periplásmica que se sintetiza en forma de molécula precursora inactiva en el citoplasma bacteriano y se transloca a través de la membrana citoplasmática. La forma activa de FkpA (FkpA madura o FkpA periplásmica) carece de la secuencia señal (aminoácidos 1 a 25) y, por lo tanto, comprende los aminoácidos 26 a 270 de la molécula precursora. La información relevante sobre la secuencia relativa a FkpA puede obtenerse fácilmente de bases de datos públicas, por ejemplo, de "SWISS-PROT" bajo el número de acceso P 45523.

50 Un pariente cercano de FkpA, denominado SlyD, está formado por un dominio N-terminal estructurado responsable de las funciones catalítica y chaperona y un extremo C-terminal mayormente desestructurado que es excepcionalmente rica en residuos histidina y cisteína (Hottenrott, S., y otros, *J Biol Chem* 272 (1997) 15697-701). Los expertos en la materia han hallado que una variante truncada en su extremo C-terminal de SlyD que comprende los aminoácidos 1-165 ejerce eficientemente sus funciones de solubilización de gp41 y gp36. Al contrario que con la SlyD salvaje, con la variante SlyD truncada (1-165) se elude con éxito el peligro de comprometer el trasiego de disulfuros.

55 Para realizar el proceso, según la presente invención, también pueden utilizarse variantes de las chaperonas comentadas más arriba, que poseen una o varias sustituciones o deleciones de aminoácidos.

60 Utilizando los procedimientos tal como se describe en los ejemplos, pueden seleccionarse fácilmente chaperonas apropiadas de otras fuentes y fragmentos o mutantes de chaperonas adecuados. Pueden utilizarse también, ya sea en forma libre o unidas covalentemente a una glicoproteína de superficie retroviral para producir un complejo

65

rsgp-chaperona soluble. En una realización preferente, según la presente invención, una chaperona PPIasa competente para la unión es unida recombinantemente a una glicoproteína de superficie retroviral dando lugar a una elevada expresión del producto génico en el citoplasma bacteriano. Una PPIasa competente para la unión, tal como se menciona en la presente invención, incluye al menos la unidad funcional que media la unión a substratos polipéptidos extendidos (es decir, el grupo de unión a substratos o chaperona), independientemente de su actividad PPIasa catalítica.

Los inventores han observado también que algunas chaperonas que no pertenecen a la clase PPI de catalizadores de plegamiento pueden formar un complejo soluble con una glicoproteína de superficie retroviral. Por lo tanto, otra realización preferente, de acuerdo con la presente invención, es un complejo soluble entre Skp (también conocido como OmpH; Missiakas, D. y otros, Mol Microbiol 21 (1996) 871-84) y una glicoproteína de superficie retroviral. Otra realización preferente es un complejo soluble que comprende una glicoproteína de superficie retroviral y GroEL o partes del mismo. También se pueden utilizar chaperonas homólogas a Skp.

Es conocido (por ejemplo, Scholz y otros, citado más arriba) que las PPI modulares se unen con preferencia a proteínas desnaturalizadas o parcialmente desnaturalizadas. Recientemente se ha observado que las PPIasas poseen la sorprendente propiedad de no solamente catalizar el plegamiento de proteínas, sino también de formar complejos estables con dichas proteínas, confiriéndoles de este modo solubilidad. Sorprendentemente, las PPIasas estudiadas (tales como TF, SlyD y FkpA) se unen a y de este modo, por ejemplo, solubilizan glicoproteínas de superficie retroviral plegadas similares a las nativas. La gp41 "similar a la nativa" o "plegada similar a la nativa", según la presente invención, se caracteriza por un elevado contenido helicoidal en la estructura secundaria evaluada mediante DC-UV lejana y por contactos terciarios evaluados mediante DC-UV cercano, que se reflejan en la típica "huella gp41", tal como se muestra en las figuras 1B y 5, respectivamente. Además el espectro UV de la gp41 "similar a la nativa", según la presente invención, no muestra una absorción a longitudes de onda superiores a 320 nm (que apuntarían la presencia de partículas dispersantes de la luz tales como agregados).

Existe gran cantidad de información sobre la formación de complejos entre biomoléculas modelo, por ejemplo entre un anticuerpo y un antígeno (como revisión ver Braden, B. C. y Poljak, R. J., Faseb J 9 (1995) 9-16). Habitualmente, la formación y disociación de complejos se producen en paralelo, el complejo y los componentes de la unión coexisten en equilibrio. Igualmente, lo mismo parece ser cierto para complejos entre chaperonas PPI y proteínas amiloidogénicas, tal como se describe en la presente invención.

La formación de un complejo, tal como se describe en la presente invención, es una propiedad especialmente importante porque se ha observado que los complejos entre la chaperona PPI y una proteína que es esencialmente insoluble, por ejemplo bajo condiciones de tampón fisiológicas, son fácilmente solubles, por ejemplo bajo condiciones de tampón fisiológicas. Los antígenos solubles bajo condiciones fisiológicas son una tremenda ventaja en aplicaciones diagnósticas. Puede utilizarse directamente, por ejemplo, como material estándar. Además pueden conjugarse con marcadores adecuados o con grupos de unión adecuados.

Tal como se ha comentado anteriormente, gp36 de VIH-2 ejerce funciones similares (es decir, fusión a la membrana y entrada de virus) y es de una relevancia diagnóstica similar a gp41 de VIH-1. En esta solicitud se comentan muchos problemas técnicos utilizando gp41 del VIH-1 como ejemplo prototípico de glicoproteína de superficie retroviral. Solamente por motivos de claridad, la discusión y descripción se centran predominantemente en la gp41 del VIH-1. Sin embargo, consideraciones similares son aplicables a otras glicoproteínas de superficie retroviral, especialmente para gp36 de VIH-2 y gp21 de HTLV.

Se conoce que los aislados naturales de VIH-1 y VIH-2 pueden comprender variantes de las secuencias de aminoácidos inicialmente aisladas y descritas. Dichas variantes naturales así como las sintetizadas mediante ingeniería genética de las rsgp de virus de la inmunodeficiencia de mamíferos también se hallan dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención, en una realización preferente se refiere a variantes del rsgp o glicoproteína transmembrana del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Se dan a conocer variantes que comprenden sustituciones de aminoácidos específicos en el dominio N-helicoidal de VIH-1 gp41 o de VIH-2 gp36.

Las posiciones de aminoácidos de los dominios N-helicoidal y C-helicoidal involucrados en contacto hélice a hélice se conocen de la literatura para VIH-1 gp41 y se pueden extrapolar al homólogo gp36 de VIH-2. Se ha descubierto que mutando estas posiciones se influye en las características de gp41 o gp36, respectivamente, especialmente en el contexto de una proteína de fusión que comprende esta variante y un dominio de chaperona PPI.

Las posiciones de los aminoácidos "a" y "d" en la proyección de la helicoide del cierre de gp41 leucina son objetivos preferentes para crear una variante de acuerdo con la presente invención. Los residuos de aminoácidos en posición "a" (numerados de acuerdo con Chan, D. C. y otros, Cell 89 (1997) 263-73) son Q552, I559, L566, I573 y I580; las respectivas posiciones "d" son I548, L555, Q562, T569 y L576.

5 Para mejorar la solubilidad sin comprometer la integridad helicoidal del motivo de cierre, es preferible que las posiciones de mutación estén separadas entre sí en más de una espira helicoidal. Este prerrequisito se cumple, por ejemplo, por sustitución de los residuos "a" consecutivos Q552, I559, L566 y I573, así como por ejemplo por sustitución de los residuos "d" consecutivos I548, L555, Q562 y T569. En otras palabras, los residuos mutados son separados unos de otros, como mínimo, con 6 residuos de aminoácido de tipo salvaje, siguiendo así exactamente el motivo heptad. También es posible mutar ambos residuos "a" y "d" dentro de una variante dentro de la condición antes mencionada de que las posiciones de sustitución estén separadas entre sí por más de una espira helicoidal.

10 De manera similar, se encontraron sorprendentemente alteraciones en el ectodominio gp36 de VIH-2 dando lugar a una proteína recombinante fácilmente soluble cuando se fusionan a SlyD o FkpA. En este caso, las posiciones "a" son Q551, V558, L565, T572, V579, y las posiciones "d" son I547, L554, Q561, T568 y L575.

15 De manera preferente, de 1 a 6 aminoácidos seleccionados entre el grupo de posiciones que comprende las posiciones Q552, I559, L566, I573, I580, I548, L555, Q562, T569 y L576 de VIH-1 gp41 o Q551, V558, L565, T572, V579, I547, L554, Q561, T568 y L575 de VIH-2 gp36, respectivamente, están sustituidos por un aminoácido más reducido o más hidrofílico.

20 Preferentemente, las posiciones de aminoácidos a sustituir son seleccionadas entre el grupo de posiciones que consiste en Q552, I559, L566, I573 y I580 de VIH-1 y del grupo que consiste en L554, Q561, T568 y L575 de VIH-2, respectivamente.

25 En una realización preferente, la presente invención se refiere a una variante de VIH-1 gp41 que comprende, como mínimo, uno y, como máximo, cuatro sustituciones de aminoácidos en posiciones "a" seleccionadas del grupo de posiciones Leu 555, Leu 566, Ile 573 y Ile 580, de manera que estas posiciones son las posiciones conocidas por la secuencia de tipo salvaje gp41 descrita en SEQ ID N°: 1 y corresponden a estas posiciones conocidas a partir de aquellas, caracterizándose porque el aminoácido de sustitución es o son, respectivamente e independientemente, seleccionados a partir del grupo que consiste en serina, treonina, asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico. Esta realización preferente de la presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que se pueden prever variantes de gp41 de tipo salvaje que representan mejoras significativas en comparación con el correspondiente polipéptido de secuencia gp41 de tipo salvaje. Las sustituciones de aminoácidos que conducen a las variantes de la presente invención se describen basándose en la composición del aminoácido y numeración de la secuencia de tipo salvaje gp41, tal como se ha dado a conocer por Chan, D. C., y otros, Cell 89 (1997) 263-73) y se indican en SEQ ID N°: 1.

35 Evidentemente, las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente invención se pueden utilizar también para sustituir aminoácidos en posiciones correspondientes de secuencia dentro de gp41 o de otros aislados conocidos de VIH-1, pero todavía no identificados. El término "correspondiente a una posición" se utiliza para indicar que aislados de VIH-1 y variantes de los mismos se pueden encontrar también o se pueden generar comprendiendo aminoácidos adicionales o careciendo de aminoácidos, que después de alineación de secuencia a SEQ ID N°: 1 resulta en un número absoluto diferente para la posición de secuencia o motivo de secuencia correspondiente.

40 La alineación múltiple y comparación de una secuencia gp41 con la secuencia de tipo salvaje SEQ ID N°: 1 se lleva a cabo con el programa PileUp de GCG Package Version 10.2 (Genetics Computer Group, Inc.). El programa PileUp crea una alineación de secuencia múltiple utilizando una simplificación del método de alineación progresiva de Feng, D. F. Doolittle, R. F., J Mol Evol 25 (1987) 351-60 y las matrices de puntuación para residuos de aminoácidos idénticos, similares o distintos se definen de acuerdo con ello. Este proceso se empieza por la alineación por pares de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo ("cluster") puede ser alineado a continuación con la secuencia siguiente más relacionada o grupo de secuencias alineadas. Dos grupos de secuencias pueden ser alineados por una simple extensión de la alineación por pares de dos secuencias individuales. La alineación final se consigue por una serie de alineaciones progresivas, por pares, que incluyen secuencias y grupos ("clusters") crecientemente no similares, hasta que todas las secuencias han sido incluidas en la alineación final por pares. Las posiciones de aminoácidos de un nuevo aislado de VIH-1 o de moléculas de ingeniería genética gp41 que corresponde a las posiciones 555, 566, 573 y 580 de la secuencia de tipo salvaje, se localizan de este modo fácilmente.

55 Una variante preferente de un polipéptido de VIH-1 gp41, de acuerdo con la presente invención se caracteriza por comprender una sustitución de aminoácido en la posición 555, en el que Leu 555 está sustituido por ácido aspártico o ácido glutámico, siendo la sustitución por ácido glutámico la más preferente.

60 Otra variante preferente de un polipéptido de VIH-1 gp41, de acuerdo con la presente invención se caracteriza por comprender una sustitución de aminoácido en la posición 556, en el que Leu 566 está sustituido por ácido aspártico o ácido glutámico, siendo la sustitución por ácido glutámico la más preferente.

65 Otra variante preferente de un polipéptido de VIH-1 gp41, de acuerdo con la presente invención se caracteriza por comprender una sustitución de aminoácido en la posición 573, en el que Ile 573 está sustituido por serina o treonina, siendo la sustitución por serina la más preferente.

Una variante preferente de un polipéptido de VIH-1 gp41, de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque comprender una sustitución de aminoácido en la posición 580, en el que Ile 580 está sustituido por ácido aspártico o ácido glutámico, siendo la sustitución por ácido glutámico la más preferente.

La presente invención se refiere también a una variante de VIH-2 gp36, que comprende, como mínimo, una sustitución de aminoácido y, como máximo, tres sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre el grupos de posiciones Leu 554, Leu 565 y Val 579, en el que estas posiciones son las posiciones conocidas por la secuencia VIH-2 gp36 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 2) o corresponden a las posiciones conocidas a partir de la misma, caracterizándose porque el aminoácido de sustitución es o se han seleccionado respectivamente e independientemente del grupo que consiste en serina, treonina, asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico.

La numeración sigue la secuencia de tipo salvaje (SEQ ID N°: 2) publicada por Guyader, M., y otros, Nature 326 (1987) 662-9. Las posiciones de aminoácidos dentro de gp36, que corresponden a las posiciones conocidas por esta secuencia se determinan tal como se ha descrito anteriormente para gp41.

Una variante preferente de un polipéptido de VIH-2 gp36, de acuerdo con la presente invención se caracteriza por comprender una sustitución de aminoácido en la posición 554, en el que Leu 554 está sustituido por ácido aspártico o ácido glutámico, siendo la sustitución por ácido glutámico la más preferente.

Una variante preferente de un polipéptido de VIH-2 gp36, de acuerdo con la presente invención se caracteriza por comprender una sustitución de aminoácido en la posición 565, en el que Leu 565 está sustituido por ácido aspártico o ácido glutámico, siendo la sustitución por ácido glutámico la más preferente.

Una variante preferente de un polipéptido de VIH-2 gp36, de acuerdo con la presente invención se caracteriza por comprender una sustitución de aminoácido en la posición 579, en el que Val 579 está sustituido por ácido aspártico o ácido glutámico, siendo la sustitución por ácido glutámico la más preferente. En una realización preferente, la variante gp41 o la variante gp36, respectivamente, comprende sustituciones en dos de las posiciones de aminoácidos, tal como se ha decidido anteriormente. También son preferentes las variantes que comprenden tres sustituciones de aminoácidos. En otra realización preferente, la variante gp41 comprende sustituciones en las cuatro posiciones de aminoácidos explicadas anteriormente de forma detallada.

En una realización preferente, la secuencia completa de gp41 o gp36, respectivamente (es decir el ectodominio sin el péptido de fusión y el segmento transmembrana) o de la correspondiente proteína de la envoltura viral de un virus de la inmunodeficiencia de mamífero (por ejemplo gp21 de HTLV), se utiliza para formar un complejo con una chaperona PPI. También es concebible la utilización de fragmentos de una glicoproteína de superficie viral tales como el de gp41 de VIH-1 descrito por Lu y otros, citado más arriba. Dichos fragmentos comprenden preferentemente la hélice C-terminal así como la hélice N-terminal de la parte extracelular de gp41.

Puede producirse mediante técnicas recombinantes, según procedimientos estándar, una gp41 relevante desde la perspectiva diagnóstica que comprende los aminoácidos en las posiciones 535 a 681 (nomenclatura según Chan, D. C., y otros, Cell 89 (1997) 263-73). Tal como se describe en la figura 1 de Lu y otros, citado más arriba, otra molécula gp41 interesante abarca los aminoácidos 540-669 de la molécula precursora gp160.

Como ejemplo típico de una glicoproteína de superficie retroviral, la pequeña proteína de la envoltura del VIH es extremadamente difícil de manejar y muestra propiedades bastante poco habituales. Como se ha mencionado previamente, una de las características más críticas de la molécula e-gp41 es su insolubilidad en condiciones de tampón fisiológicas. La gp41 producida de forma recombinante es soluble y muestra una estructura similar a la nativa a un pH de 3,0 y una potencia iónica baja. Sin embargo, incluso a este pH, sigue siendo sensible a la concentración de sal en el tampón. Dependiendo de la sal utilizada, gp41 precipita en presencia de mas de 100 a 500 mM de sal. Como se comentará en mayor detalle más adelante, puede (de nuevo) solubilizarse (en forma desnaturalizada) mediante agentes caotrópicos.

Las condiciones de tampón fisiológicas se entiende habitualmente que corresponden a las condiciones de sal y pH halladas en el plasma o suero de los animales y se definen por un valor de pH alrededor de 7,4 y una concentración de sal de aproximadamente 150 mM. El complejo rsgp-chaperona, según la presente invención, es fácilmente soluble bajo dichas condiciones de tampón. La rsgp presente en el mismo es inmunológicamente activa, lo que apunta a una estructura similar a la nativa. Mientras que gp41 en ausencia de, o sin un pre-tratamiento con un detergente adecuado es esencialmente insoluble bajo condiciones de tampón fisiológicas (por ejemplo fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM), el complejo descrito según la presente invención, es fácilmente soluble tras el replegamiento, según el protocolo adecuado. El ectodominio gp41, tal como está comprendido en el complejo de la presente invención, es soluble al menos a una concentración de 100 nM, preferentemente a una concentración de 1 µM y superior, y de forma más preferente a 10 µM o superior. Por lo tanto, se incrementa substancialmente la solubilidad de concentraciones sub-nanomolares a aproximadamente micromolares.

Para una mejor comprensión del alcance de la presente invención, es necesario resaltar que las condiciones de tampón aplicadas para la solubilización y renaturalización puede modificarse según sea necesario y adecuado y no deben entenderse como una restricción indebida de la presente invención, que se lleva a cabo con éxito en un amplio abanico de condiciones de tampón.

5 La concentración global de sal del tampón fisiológico no es crítica en tanto en cuanto se tenga el cuidado de que el complejo chaperona-gp41 no se disocie y gp41 permanezca en solución. Preferentemente el tampón fisiológico comprende al menos 10 mM del sistema tampón y como máximo 200 mM. El resto de los componentes del tampón, si están presentes, pueden ser una sal sin capacidad de tampón significativa, por ejemplo, cloruro sódico. El tampón
10 fisiológico preferentemente posee una concentración de sal entre 20 y 500 mM, más preferentemente entre 50 y 300 mM y de forma más preferente entre 100 y 200 mM.

En un proceso, según la presente invención, puede variarse el tampón fisiológico a un valor de pH entre 5,0 y 8,5; más preferentemente, el valor de pH de dicho tampón está entre 5,5 y 8,3. Incluso más preferentemente, las
15 condiciones de dicho tampón fisiológico se definen por las concentraciones de sal expuestas más arriba y una valor de pH entre 6,0 y 8,0; de forma más preferente, el pH de dicho tampón fisiológico está entre 6,5 y 7,8.

Según un proceso, tal como se describe en la presente invención, se solubiliza una glicoproteína de superficie retroviral bajo condiciones de tampón no fisiológicas, se añade la chaperona (o ya está presente como un dominio de proteína adicional unido covalentemente), y a continuación se ajusta a condiciones tampón fisiológicas la mezcla que comprende la glicoproteína de superficie retroviral y la chaperona. Mientras que una glicoproteína de superficie retroviral sola precipitaría espontáneamente al realizar este procedimiento, sorprendentemente se mantiene en solución en el proceso anterior. Esta hallazgo importante probablemente debido a la formación de un complejo entre la glicoproteína de superficie retroviral y la chaperona.

25 En el caso de la producción recombinante de gp41 en *E. coli*, la gp41 producida de forma recombinante se obtiene en forma de cuerpos de inclusión. Este material se solubiliza utilizando un reactivo altamente caotrópico, por ejemplo tiocianato de guanidinio 7,0 M. En estas condiciones, el polipéptido gp41 se encuentra mayormente desestructurado. Al cambiar el tampón en las etapas adecuadas a ácido fórmico 30 mM a pH 3,0, la gp41 en solución asume lo que se percibe como su estructura completamente helicoidal similar a la nativa. Un modo fácil de controlar el estado de plegamiento correcto o incorrecto de una proteína es analizar el espectro DC correspondiente en las regiones amídica (185-250 nm) y aromática (260-320 nm). Además, puede obtenerse fácilmente información sobre partículas dispersantes de la luz (como los agregados) a partir de los espectros UV estándar.

35 Lo que es importante resaltar aquí es el hecho de que la glicoproteína de superficie retroviral dentro del complejo chaperona-glicoproteína de superficie retroviral, según la presente invención, adopta lo que se considera que es un plegamiento similar al nativo. Por el contrario, la glicoproteína de superficie retroviral, que se ha solubilizado a pH neutro mediante agentes caotrópicos, está mayormente desestructurada, perdiendo de este modo epítopos de conformación ordenada. También es posible alternativamente solubilizar una glicoproteína de superficie retroviral utilizando detergentes. Por ejemplo, el dodecil sulfato de sodio (SDS) se ha utilizado con éxito para solubilizar gp41. Sin embargo, dicho "material solubilizado con SDS" no es un material de elección, por ejemplo, para ser utilizado en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos de gp41. Además, (tal como se ha explicado anteriormente) estos inmunoensayos detectan, también, preferentemente, anticuerpos de epítopos conformacionales de gp41, y no puede excluirse que los detergentes eliminen parcialmente los epítopos conformacionales.

45 Preferentemente, el complejo rsgp-chaperona, según la presente invención, se caracteriza por que la rsgp se encuentra plegada de forma similar a la nativa. La rsgp plegada de forma similar a la nativa dentro de dicho complejo muestra, por ejemplo, las características inmunológicas o físicas requeridas.

50 El plegamiento similar al nativo se evalúa preferentemente mediante espectroscopía DC-UV cercana, que informa sobre los contactos terciarios dentro de proteínas globulares compactas. Es conocido que la gp41 es fácilmente soluble a un pH de aproximadamente 3,0 y una concentración de sal de baja potencia iónica. Los datos de la DC-UV cercana demuestran que bajo dichas condiciones de tampón, gp41 muestra una señal de elipticidad característica con la típica huella de una proteína globular plegada de forma similar a la nativa. Tal como se muestra en la figura 5, la gp41 parte de un péptido de fusión que comprende gp41 y FkpA muestra este típico espectro DC-UV cercano en tampón ácido. Bajo condiciones de tampón fisiológicas, el espectro DC-UV cercano de un complejo soluble, según la presente invención, está compuesto por espectros de la chaperona correctamente plegada y la gp41 plegada de forma similar a la nativa. Ello se muestra para la proteína de fusión FkpA-gp41 en la figura 7.

60 En una realización preferente, según la presente invención, el plegamiento similar al nativo de gp41 en un complejo gp41-chaperona se evalúa analizando el DC-UV cercano. Es preferente que este DC-UV cercano se utilice para demostrar que ambas moléculas, gp41 y la chaperona, presentan un plegamiento similar al nativo.

65 La producción del complejo chaperona-gp41 soluble parte de condiciones de tampón no fisiológicas. En el caso de la formación de un complejo entre chaperona libre y proteína diana libre (por ejemplo gp41 de VIH-1), el tampón "no fisiológico" debe cumplir los requisitos, de (a) gp41 está presente en su estructura similar a la ácida nativa, y (b) la

chaperona PPI es al menos parcialmente funcional (es decir, es competente para la unión). Partiendo de dichas condiciones de tampón, la chaperona se une a la proteína amiloidogénica, siendo posible un cambio de las condiciones de tampón no fisiológico a condiciones más o menos fisiológicas sin que se produzca la precipitación de la proteína amiloidogénica.

5 Mientras que las chaperonas habitualmente se unen a proteínas desnaturalizadas y actúan sobre las mismas, facilitando de este modo su (re)plegamiento correcto, la situación en la que se basa la presente invención es totalmente diferente. La gp41 solubilizada bajo condiciones de tampón no fisiológico adecuadas parece estar presente en su forma similar a la nativa (véase las figuras 1A y 1B y la figura 5). A diferencia de la visión habitual de las funciones de una chaperona, en el método de la presente invención, la chaperona parece unirse a la proteína plegada de forma similar a la nativa y estabiliza dicha proteína a condiciones de tampón bajo las cuales gp41 sería de otro modo insoluble y precipitaría.

15 En una realización preferente, según la presente invención, la chaperona PPI se selecciona del grupo formado por FkpA y SlyD y el factor disparador.

20 Se ha observado que especialmente FkpA o SlyD mejoran la solubilidad de gp41 y forman complejos bastante estables con la misma. Una realización preferente adicional se caracteriza, por lo tanto, porque la chaperona se selecciona del grupo formado por FkpA y SlyD. La chaperona FkpA es la más preferente.

25 Tal como se ha descrito en mayor detalle más arriba, también pueden utilizarse fragmentos de chaperonas para provocar la función deseada. En el caso de las chaperonas modulares, como las FKBP, que comprenden un módulo catalítico y un módulo de unión, es preferente que dichos fragmentos comprendan al menos el dominio de unión, o que estos fragmentos muestren al menos una función esencialmente comparable al dominio de unión.

30 Tal como se ha descrito más arriba, dichos complejos solubles que comprende gp41 de VIH-1, o un homólogo derivado de otro virus de la inmunodeficiencia de mamíferos, puede prepararse fácilmente mezclando la chaperona PPI (producidas, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes) y una gp41 producida de forma recombinante. A continuación se forma el complejo entre las dos moléculas independientes, es decir de forma intermolecular.

35 La formación de complejos es un proceso dinámico en el cual la disociación y la re-asociación se producen en paralelo. Ello es cierto tanto para la asociación intermolecular como para la asociación intramolecular (por ejemplo en un constructo de fusión) entre, por ejemplo, FkpA y gp41. Como gp41 precipita inmediata y cuantitativamente en una solución de tampón fisiológica, la concentración de ambos componentes debe escogerse para garantizar que solamente está presente una concentración no crítica o no agregante de gp41 libre y que la gran mayoría de la gp41 está unida y estabilizada en forma de complejo gp41-chaperona.

40 Dependiendo de la chaperona utilizada, se ha observado que es necesario mezclar en términos molares al menos 2 veces el número de chaperonas respecto a las moléculas de gp41. En una realización preferente, la invención se refiere, por lo tanto, a un reactivo que comprende una mezcla de gp41 y chaperona, preferentemente FkpA. Preferentemente, dicha mezcla contiene FkpA en exceso molar respecto a gp41. Es preferente que esté presente entre 3 y 10 veces más FkpA. La relación molar más preferente entre FkpA y gp41 es entre 4 y 6.

45 Se ha observado que la formación de un complejo intramolecular, por ejemplo entre los diferentes dominios de una proteína que comprende unidos covalentemente al menos un dominio rsgp y al menos un dominio chaperona-PPI, conlleva efectos ventajosos adicionales, por ejemplo en términos de solubilidad y facilidad de producción. Se ha observado, por ejemplo, que una relación 1:1 (entre rsgp y chaperona) es suficiente para formar el complejo soluble si ambos dominios están unidos covalentemente.

50 Un complejo soluble que comprende una glicoproteína de superficie retroviral y una chaperona en una forma unida recombinantemente representa otra realización preferente, según la presente invención. Las rsgps más preferentemente comprendidas en dicho polipéptido recombinante son gp41 de VIH-1 y gp36 de VIH-2.

55 Para una proteína recombinante que comprende al menos un dominio rsgp y al menos un dominio chaperona-PPI, la transferencia de condiciones de tampón no fisiológicas a fisiológicas puede lograrse de modos diferentes. Se obtienen fácilmente complejos intramoleculares entre gp41 y FkpA ajustando las condiciones de tampón no fisiológicas a condiciones de tampón fisiológicas mediante diálisis, dilución rápida o replegamiento facilitado por matriz. La mezcla formada por el complejo gp41-chaperona soluble puede utilizarse directamente para su modificación.

60 También puede producirse un complejo soluble formado, por ejemplo, por gp41 y una chaperona PPI, según la presente invención, partiendo de un polipéptido que comprende los dominios de ambas proteínas (gp41 y chaperona) obtenido mediante técnicas recombinantes. El complejo gp41-chaperona en el mismo es intramolecular por naturaleza. Preferentemente, el polipéptido recombinante, según la presente invención, comprende gp41 y una chaperona o gp36 y una chaperona. En aún otra realización preferente, la presente invención se refiere a una

65

proteína recombinante que comprende al menos un dominio rsgp y al menos dos dominios chaperona-PPI. También son preferentes los polipéptidos recombinantes que comprenden un dominio rsgp y dos chaperonas-PPI.

El polipéptido recombinante utilizado para obtener un complejo gp41-chaperona soluble, según la presente invención, se expresa aplicando técnicas de biología molecular estándar. Preferentemente, el gen de la chaperona se ubica en el marco por encima del gen de la proteína diana dentro de un vector de expresión que comprende la información genética de gp41 y de la chaperona y opcionalmente también la información genética de una secuencia de enlazador peptídico adecuada. Un huésped preferente para la producción a gran escala de dicha proteína de fusión recombinante es *E. coli*.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un complejo soluble que comprende gp41 o gp36, respectivamente, y una chaperona seleccionada de la clase de chaperonas peptidil-prolil-isomerasa. Es aún más preferente que este complejo soluble sea un complejo intramolecular, preferentemente un complejo intramolecular dentro de un polipéptido recombinante que comprende gp41 o gp36 y una chaperona PPI. De forma más preferente, la parte chaperona del polipéptido recombinante carece de péptido de señal de exporte alguno (o la molécula precursora correspondiente) y se corresponde con la chaperona PPI madura. Dado que en esta realización preferente la proteína recombinante carece de una secuencia señal funcional, el producto génico se acumula en el citoplasma bacteriano.

Una característica llamativa de la gp41 contenida en FkpA-gp41 producida recombinantemente es su excepcional solubilidad en comparación con el ectodominio gp41 "sin chaperona". Es interesante que el "material caotrópico" (es decir FkpA-gp41 en GuHCl 6,0-7,0 M) puede replegarse de maneras diferentes, resultando todas ellas en una forma similar a la nativa termodinámicamente estable y soluble. El replegamiento se consigue con rendimientos elevados, tanto mediante diálisis como mediante dilución rápida, así como mediante cromatografía de exclusión de tamaño renaturalizadora o replegamiento facilitado por matriz. Estos hallazgos sugieren que en su forma unida covalentemente, el polipéptido de fusión gp41-FkpA es una proteína termodinámicamente estable en vez de metaestable.

El polipéptido recombinante FkpA-gp41 comprende dos dominios de proteína que poseen requisitos de plegamiento diferentes. Dado que el protocolo de purificación incluye una etapa inicial de desnaturalización, es obligatorio que el plegamiento de la chaperona sea reversible. De hecho, existen evidencias espectroscópicas convincentes del replegamiento reversible e independiente tanto de FkpA como de gp41 dentro del complejo de proteínas unidas covalentemente. Se ha observado que el replegamiento de SlyD truncado en el extremo C-terminal también es reversible.

También es preferente un polipéptido recombinante que comprende una proteína de superficie retroviral y una chaperona que comprende adicionalmente una secuencia de enlazador peptídico adecuada entre los dos dominios de polipéptido. Dicha secuencia de enlazador peptídico se selecciona para garantizar una asociación intramolecular óptima de la rsgp y del dominio chaperona utilizados. Preferentemente, dicha secuencia enlazadora posee aproximadamente 20 aminoácidos de longitud y comprende aminoácidos que contribuyen a la flexibilidad y la solubilidad, tales como por ejemplo glicina y serina. Preferentemente, el enlazador tiene una longitud de 10 a 50 aminoácidos. Más preferentemente, la longitud es de 12 a 40 aminoácidos, y de forma más preferente, el enlazador tiene una longitud de entre 15 y 35 aminoácidos. La rsgp y la chaperona están siempre muy cercanas (mantenidas juntas por ejemplo mediante el enlazador adecuado). En una realización preferente, el polipéptido recombinante comprende la FkpA madura unida a su proteína diana a través de un enlazador flexible. Ello, tal como indican los datos, aporta un efecto estabilizante adicional.

Se ha hallado sorprendentemente que gp41, formando parte del complejo intramolecular entre una chaperona PPI y gp41, es tanto soluble como estable. Lo mismo es cierto para el complejo intramolecular que comprende una chaperona PPI y gp36 o una chaperona PPI y gp21 de HTLV. La estabilidad mejorada en dicho complejo aporta ventajas adicionales. Por ejemplo, es posible obtener una molécula gp41-chaperona recombinante completamente renaturalizada de forma muy sencilla. La proteína recombinante se solubiliza inicialmente mediante tratamiento con un agente caotrópico (por ejemplo cloruro de guanidinio). Simplemente pasando el material solubilizado a través de una columna de filtración en gel, equilibrada con el tampón fisiológico adecuado, puede obtenerse una proteína completamente renaturalizada que comprende los dominios de las proteínas unidos covalentemente (véase ejemplo 2.3 y figuras 7 y 8).

El complejo gp41-chaperona intramolecular soluble muestra aún otra ventaja adicional llamativa; es bastante estable frente a los efectos desnaturalizantes de los detergentes. Este efecto se vuelve aún más pronunciado si la proteína de fusión contiene dos chaperonas y una gp41 o una gp36, respectivamente. La mayoría de inmunoensayos se realizan en presencia de detergentes para disminuir, y al menos parcialmente evitar, los problemas provocados por la unión no específica. En el caso del diagnóstico del VIH, se utilizan detergentes bastante potentes por la razón mencionada, pero también para desintegrar y romper las partículas virales y facilitar de este modo la detección de los antígenos virales, como gp24.

- 5 El ectodominio gp41 producido de forma recombinante solubilizado en SDS (dodecil sulfato de sodio) no es inmunoreactivo en un tampón de ensayo utilizado de forma rutinaria, por ejemplo en la detección de anticuerpos anti-VIH o de antígeno p24 (véase figura 9). Bajo las mismas condiciones de tampón, sin embargo, el gp41, que forma parte de un complejo intramolecular con una chaperona PPI, según la presente invención, es altamente inmunoreactiva. Tal y como puede observarse en la figura 9, bajo las mismas condiciones de ensayo y con el suero del mismo paciente, este material da unas excelentes curvas de competición, que solamente pueden explicarse por la presencia de gp41 soluble similar a la nativa, que además es estable en presencia del detergente analizado.
- 10 Es una característica muy importante del complejo, según la presente invención, que la rsgp dentro del complejo rsgp-chaperona soluble esté plegada de forma similar a la nativa bajo condiciones de tampón fisiológicas, por ejemplo pH 7,4 en tampón fosfato 20 mM, cloruro sódico 150 mM. Ello representa una tremenda ventaja para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. En una realización preferente, la presente invención se refiere a una composición de reactivos que es soluble bajo condiciones de tampón fisiológicas, que comprende un complejo intra o intermolecular que comprende una glicoproteína de superficie retroviral y una chaperona seleccionada del grupo formado por FkpA y SlyD.
- 15 Un complejo soluble que comprende gp41 de VIH-1 plegada de forma similar a la nativa y una chaperona seleccionada de la clase de chaperonas peptidil-prolil-isomerasa representa, por lo tanto, una realización muy preferente de la presente invención.
- 20 Un complejo soluble que comprende gp36 de VIH-2 plegada de forma similar a la nativa y una chaperona seleccionada de la clase de chaperonas peptidil-prolil-isomerasa representa, por lo tanto también, una realización muy preferente de la presente invención.
- 25 Desde el punto de vista del tratamiento, el progreso realizado al dar a conocer una gp41 o gp36, respectivamente, "soluble y plegada de forma similar a la nativa" es bastante obvio. Por primera vez, por ejemplo ahora gp41, está disponible para su inyección bajo condiciones de tampón fisiológicas.
- 30 En una realización preferente, el complejo soluble descrito es utilizado para producir una composición de reactivos para utilizar como medicamento. La composición de reactivos comprende el complejo gp41-chaperona junto con excipientes fisiológicamente aceptables y, en caso apropiado, aditivos adecuados y/o sustancias auxiliares convencionales.
- 35 Es sabido que los péptidos derivados de gp41 heptad repiten o procedentes de hélice terminal de gp41 C poseen actividad antivírica (Wild, C., y otros, Proc Natl Acad Sci USA 89 (1992) 10537-41). Dificultan la entrada de los virus al interactuar específicamente con el llamado "intermediario de pinza de cabello" de gp41 (para consulta Doms, R. W. y Moore, J. P., J Cell Biol 151 (2000) F9-14). Los presentes inventores han descubierto que el complejo rsgp-chaperona, según la presente invención muestra actividad antivírica. La composición de reactivos que contiene el complejo gp41-chaperona o un complejo gp36-chaperona o ambos en dosis terapéuticamente efectiva en una primera aplicación terapéutica preferente se utiliza para la entrada de VIH y para la extensión de VIH dentro del organismo huésped ("inhibición de entrada del virus").
- 40 Representa una aplicación terapéutica preferente adicional de una composición de reactivos que comprenden un complejo gp41-chaperona para utilizar esta composición para elicitar una respuesta inmune en un mamífero. El complejo descrito pone a disposición muchos más epítomos gp41 que cualquier otro inmunógeno de VIH conocido, ver por ejemplo, Root y otros. El nuevo inmunógeno se espera, por lo tanto, que induzca una respuesta inmune mucho más amplia.
- 45 Desde el punto de vista de los procedimientos diagnósticos, las ventajas obvias del complejo rsgp-chaperona soluble, según la presente invención son, por ejemplo, el incremento de la estabilidad de las glicoproteínas de superficie retroviral, tales como gp41 bajo condiciones fisiológicas, y/o el aumento en la sensibilidad diagnóstica, y/o el incremento en el número de epítomos conformacionales presentes, y/o la posibilidad de marcar fácilmente una rsgp adecuadamente plegada, como gp 41.
- 50 Son marcadores bien conocidos los grupos marcadores o efectores, como los grupos de unión a fase sólida, Un complejo rsgp-chaperona soluble marcado representa una realización adicional preferente, según la presente invención.
- 55 El grupo marcador puede seleccionarse entre cualquier grupo de marcadores detectables conocidos, tales como colorantes, grupos de marcado luminiscente, tales como grupos quimioluminiscentes, por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos, o colorantes fluorescentes, por ejemplo fluoresceína, cumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina, y derivados de los mismos. Otros ejemplos de grupos marcadores son los complejos metálicos luminiscentes, tales como los complejos de rutenio o europio, enzimas, por ejemplo tal como se utilizan para el ELISA o el CEDIA (Inmunoensayo por Clonado de Donante Enzimático, por ejemplo EP-A-0 061 888), y radioisótopos.
- 60
- 65

Los grupos efectores comprenden, por ejemplo, un componente de un par de unión bioafín. Al realizar un ensayo, el grupo efector interactúa específicamente y preferentemente de forma no covalente con el otro componente del par de unión bioafín. Son ejemplos de pares de unión hapteno o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, azúcar/lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario, y receptor/ligando, por ejemplo, receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea. Los miembros de pares de unión preferentes comprenden hapteno, antígeno y hormona. Especialmente preferentes son los haptenos como la digoxina y la biotina y análogos de los mismos.

El complejo soluble que comprende una rsgp y una chaperona PPI se utiliza preferentemente en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra la rsgp. Preferentemente se utilizan complejos gp41- y/o gp36-chaperona. En una realización muy preferente, un complejo soluble marcado que comprende gp41 y una chaperona PPI se utiliza en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra gp41. De forma más preferente, el complejo marcado es un complejo intramolecular dentro de un polipéptido recombinante que comprende la chaperona PPI y gp41.

Los inmunoensayos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos para realizar dichos ensayos así como las aplicaciones prácticas y procedimientos, están resumidos en los manuales relacionados. Son ejemplos de manuales relacionados Tijssen, P., Preparation of enzym-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates ("Preparación de enzima-anticuerpo u otros conjugados enzima-macromolécula) en "Practice and theory of enzyme immunoassays" ("Práctica y teoría de los inmunoensayos enzimáticos") (1990) 221-278, Eds. R. H. Burdon y v. P. H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam) y varios volúmenes de Tijssen, en "Methods in Enzymology" ("Métodos en enzimología") (1980), Eds. S. P. Colowick, N. O. Caplan and S. P., Academic Press), que versan sobre métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84 92 y 121.

El novedoso complejo rsgp-chaperona PPI soluble, puede utilizarse para mejorar ensayos para la detección de anticuerpos anti-VIH independientemente del modo de detección (por ejemplo ensayo radioisotópico, inmunoensayo enzimático, ensayo de electroquimioluminiscencia, etc.) o el principio en el que se basa el ensayo (por ejemplo ensayo en tira reactiva, ensayo sándwich, o ensayo homogéneo etc.).

Para la detección precoz fiable y sensible de una infección por VIH, es esencial medir tanto el antígeno viral como el anticuerpo anti-viral en muestras de fluidos corporales. El complejo soluble, según la presente invención, permite la detección de anticuerpos anti-gp41 y/o anti-gp36 en condiciones de tampón fisiológicas. La detección de anticuerpos anti-gp41 y/o anti gp-36 es una parte valiosa de dichos sistemas de detección del VIH combinados. En una realización preferente, la presente invención se refiere, por lo tanto, a sistemas de detección del VIH. En una realización preferente, la presente invención se refiere por lo tanto a sistemas de detección del VIH que comprenden la detección de anticuerpos anti-gp41 y/o anti-gp36 basados en la utilización de un complejo gp41- y/o gp36-chaperona. De forma más preferente, la detección de anticuerpos anti-gp41 y/o anti-gp36 basada en dicho complejo, se realiza conjuntamente con la detección de un antígeno VIH, preferentemente el antígeno p24.

Tal como se conoce en la técnica, los anticuerpos frente a agentes infecciosos, tales como bacterias, hongos o virus, se detectan preferentemente mediante un ensayo realizado según el concepto del puente de doble antígeno (en ocasiones este concepto de ensayo también se denomina concepto del puente de doble antígeno, porque los dos antígenos quedan unidos mediante un anticuerpo). En dicho ensayo, se requiere y utiliza la capacidad del anticuerpo de unirse a al menos dos moléculas diferentes de un antígeno determinado con sus dos (IgG, IgA, IgE) o 10 (IgM) paratopos.

La detección de anticuerpos, según el concepto de puente, puede realizarse en diferentes configuraciones de ensayo. Una configuración simple comprende el recubrimiento directo de un antígeno sobre una fase sólida y la utilización del mismo antígeno en forma marcada. Bajo condiciones adecuadas de ensayo, un anticuerpo en una muestra forma un puente entre el antígeno unido a la fase sólida y el antígeno marcado. Por lo tanto, solamente se formará el puente y podrá detectarse una señal si el anticuerpo investigado se halla presente en la muestra.

Las estructuras básicas del "antígeno de la fase sólida" y del "antígeno de detección" son preferentemente las mismas. Por ejemplo, puede utilizarse un polipéptido que comprende uno o varios epítomos directa o indirectamente recubierto sobre la fase sólida, y el mismo polipéptido sintético, unido sin embargo a un marcador, se utiliza como antígeno de detección. También es posible utilizar antígenos similares pero diferentes, que tengan reactividad inmunológica cruzada en un ensayo de puente de doble antígeno. El requisito esencial para realizar dichos ensayos es que el epítopo relevante o los epítomos relevantes estén presentes en ambos antígenos. Obviamente, existen diversas variantes del formato de ensayo de puente de doble antígeno. Dichas variantes comprenden, por ejemplo, el recubrimiento indirecto de un antígeno sobre la fase sólida. Preferentemente, un par de unión específico, de forma más preferente se utiliza el sistema biotina-estreptavidina (o avidina) para unir indirectamente un antígeno a la fase sólida. Por otro lado, el antígeno utilizado para la detección en dicho sistema puede no portar directamente un marcador (por ejemplo un radioisótopo, enzima, molécula fluorescente, etc.), sino que más bien puede ser detectable indirectamente mediante, por ejemplo portando un hapteno (por ejemplo, digoxina). Dicha detección indirecta puede entonces realizarse, por ejemplo, mediante un anticuerpo antidigoxina marcado.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un inmunoensayo, de acuerdo con el concepto de puente de doble antígeno, que comprende: un primer antígeno que comprende un primer complejo chaperona-antígeno y un segundo antígeno que comprende un segundo complejo chaperona-antígeno.

- 5 En otra realización preferente, la presente invención se refiere a un inmunoensayo, de acuerdo con el concepto de puente de doble antígeno, caracterizado porque un primer complejo chaperona-antígeno es utilizado como antígeno de captación y un segundo complejo chaperona-antígeno es utilizado como antígeno de detección.

10 Los complejos chaperona-antígeno que se describen en la presente invención aportan no solamente la solubilidad de varios péptidos que de otro modo son difíciles de manipular, sino que también permiten un inmunoensayo muy ventajoso, de acuerdo con el concepto de puente de doble antígeno.

15 Es una característica especialmente atractiva de dicho inmunoensayo, de acuerdo con el concepto de puente de doble antígeno, que es posible ahora utilizar diferentes chaperonas para formación de complejos con el antígeno unido en la fase sólida y para formación de complejo con el antígeno de detección, respectivamente. Esta modificación de un ensayo mejora adicionalmente con respecto al problema de unión no específica. Los anticuerpos de una muestra que sería reactiva a una chaperona y, por lo tanto podría provocar una señal falsa positiva, no formarán un puente si se utilizan diferentes chaperonas para acomplejar el antígeno de fase sólida y el antígeno de detección, respectivamente. Por lo tanto, en esta modalidad de la invención, la probabilidad de una señal positiva debido a unión no específica es muy reducida. En una realización preferente, la presente invención se refiere, por lo tanto, a un inmunoensayo, de acuerdo con el concepto de puente de doble antígeno que se caracteriza por el hecho de que la primera chaperona y la segunda chaperona de un primer y segundo complejo chaperona-antígeno difieren entre sí.

25 La mayoría de las chaperonas que están mejor caracterizadas se han aislado de *Escherichia coli*, la cual se utiliza ampliamente en la investigación biotecnológica. Dado que *Escherichia Coli* es una especie bacteriana ampliamente distribuida, muchos mamíferos han desarrollado anticuerpos contra proteínas derivadas de esta bacteria. Para disminuir las posibilidades de reacciones falsamente positivas provocadas por dichos anticuerpos, es preferente utilizar la menos una chaperona PPI derivadas de una especie bacteriana diferente, preferentemente una especie termofílica. Preferentemente, la chaperona de bacterias extremofílicas, especialmente del grupo de bacterias formado por *Thermatoga maritima*, *Aquifex aeolicus* y *Thermus thermophilus*.

35 La utilización de un complejo chaperona-antígeno en un inmunoensayo en general, y preferentemente en un inmunoensayo según el concepto de puente, también proporciona la posibilidad de derivatizar la chaperona de dicho complejo sin que se modifique el antígeno propiamente dicho. Se acepta generalmente que la modificación de un polipéptido por un segundo grupo molecular, por ejemplo, el acoplamiento de un marcador a la molécula, incluye el riesgo de influenciar negativamente dicho polipéptido. Por ejemplo, mediante dicho marcaje el epítipo investigado puede verse comprometido o puede provocarse unión no específica. Según la presente invención, es posible derivatizar específicamente la chaperona dentro de un complejo chaperona-antígeno.

40 En una realización preferente, un inmunoensayo, de acuerdo con el concepto de puente de doble antígeno, se caracteriza además porque el primer complejo de chaperona-antígeno, utilizado como antígeno de captación, comprende un grupo de unión de fase sólida.

45 En otra realización preferente se lleva a cabo un inmunoensayo, de acuerdo con el concepto de puente, que se caracteriza además porque el segundo complejo chaperona-antígeno, utilizado como antígeno de detección, comprende un grupo marcador.

EJEMPLOS

50 Ejemplo 1. Producción de un complejo intermolecular soluble que comprende gp41 y una chaperona PPI

1.1 Producción de FkpA de E. coli

55 Se clonó, expresó y purificó FkpA según Bothmann, H. y Pluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17100-5 con algunas modificaciones menores. Para su almacenamiento, la solución de proteína se dializó frente a 20 mM NaH₂PO₄/NaOH (pH 6,0), NaCl 100 mM y se concentró a 26 mg/ml (1 mM).

60 Para su expresión citoplasmática, la secuencia de codificación de FkpA del vector de expresión anterior se modificó para que careciera de la parte de la secuencia que codifica el péptido señal y comprendiera solamente la región de codificación de la FkpA madura.

1.2 Producción de gp41 (535-681)His₆

65 Se clonó y expresó gp41 (535-681) – His₆ en un sistema de expresión basado en el promotor T7 y se acumuló en cuerpos de inclusión en la célula huésped. Los cuerpos de inclusión aislados se disolvieron en cloruro de guanidinio

6M. La proteína etiquetada con His se purificó en una columna de Niquelato, seguido de filtración en gel en guanidinio 6M en Sephacryl 100. La proteína se replegó mediante dilución rápida tal como se describe en Wingfield, P. T., y otros, *Protein Sci* 6 (1997) 1653-60. Las condiciones finales de tampón fueron formiato sódico 30 mM, pH 3,0. El estado de plegamiento se evaluó para ambas condiciones de tampón utilizando DC-UV cercana y lejana. Como puede observarse en las figuras 1A y 1B, ambos espectros DC-UV cercano y lejano sugieren que gp41 adopta un plegamiento similar al nativo solamente a pH 3,0 en ausencia de agente caotrópico.

1.3 Cambio del pH del ectodominio gp41 (VIH) de pH 3,0 a pH fisiológico en presencia de FkpA de *E. Coli*

1.3.1 Experimento control

En un experimento control, se diluyó e-gp41 soluble (en formiato 30 mM, pH 3,0) 100 veces en unas condiciones finales de tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 7,5), NaCl 50 mM, EDTA 1mM. La concentración final de proteína fue de aproximadamente 1 μ M. Se registraron los espectros UV tras 1 minuto y 10 minutos. Es obvio a partir de los espectros UV de la figura 2 que el ectodominio sin chaperona se agrega espontáneamente al cambiar el pH a pH neutro. La figura 2 quiere resaltar la excepcional tendencia a la agregación de gp41; la agregación espontánea de la molécula va mucho más allá del nivel indicado por la línea superior.

1.3.2 Preincubación de gp41 con FkpA a pH 3,0 permite el cambio a pH neutro

Para evaluar el potencial de solubilización de la chaperona molecular FkpA, se mezclaron el ectodominio gp41 y FkpA con una relación molar 1:2 y 1:4 (en formiato 30 mM a un pH de aproximadamente 3,5) y se co-incubaron durante 1 minuto. A continuación, el complejo resultante se cambió a pH neutro mediante una dilución de 12 veces en las condiciones de tampón fosfato sódico 20 mM, pH (7,4), NaCl 50 mM, EDTA 1 mM. Las concentraciones finales de los componentes de la unión en el tubo de ensayo fueron gp41 1 μ M, FkpA 2 μ M y 4 μ M, respectivamente. Todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Tras 1 y 10 minutos, se registraron los espectros UV para evaluar la presencia de agregados en las muestras de gp41. De las figuras 3A y 3B, es evidente que FkpA reduce substancialmente la agregación de gp41 de forma dependiente de la dosis. Se han obtenido datos comparables con el "factor disparador" de *Thermatoga maritima* y con una forma truncada en el extremo C-terminal de SlyD de *E. coli*.

Ejemplo 2. Producción recombinante de gp41-FkpA unidos covalentemente

2.1 Construcción de un plásmido de expresión que comprende FkpA y gp41

En la primera etapa, se eliminó el sitio de restricción BamHI en la región de codificación de la FkpA madura de *E. coli* del plásmido del ejemplo 1.1 utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange de Stratagene (La Jolla, CA; EE.UU) con los cebadores:

5'-gcggtgttccgggtatcccaccgaattc-3' (SEQ ID N°: 3)

5'-gaattcgggtgggatacccgaacacccgc-3' (SEQ ID N°: 4)

El constructo se denominó EcFkpA(Δ BamHI)[GGGS]₃.

En una segunda etapa, se amplificó un fragmento génico que codifica los aminoácidos 535-681 de la proteína de la envoltura de VIH-1 mediante PCR a partir del constructo del ejemplo 1.2 utilizando los cebadores:

5'-cgggatccgggtggcggttcaggcggtggctctggtggcggtacgctg-acgggtacaggccag-3' (SEQ ID N°: 5)

5'-ccgctcgaggtaccacagccaattgttat-3' (SEQ ID N°: 6)

El fragmento se insertó en EcFkpA(Δ BamHI)[GGGS]₃ utilizando los sitios de restricción *Bam*HI y *Xho*I.

Se insertaron los codones del enlazador glicina-serina entre FkpA y e-gp41 con el cebador inverso de la clonación de FkpA y el cebador directo de la clonación de e-gp41.

Se secuenció el constructo resultante y se halló que codificaba la proteína deseada.

2.2 Purificación de la proteína de fusión

Se cultivaron células *E. coli* BL21 que contenían el plásmido de expresión hasta una OD₆₀₀ de 0,7 y se indujo la sobre-expresión citoplasmática añadiendo IPTG 1 mM a una temperatura de crecimiento de 37 °C. Cuatro horas después de la inducción, se recolectaron las células mediante centrifugación (20 minutos a 5.000 g). El sedimento de bacterias se resuspendió en fosfato sódico 50 mM pH 7,8, GuHCl (cloruro de guanidinio) 6,0 M, imidazol 5 mM y se agitó a temperatura ambiente (10 minutos) para obtener una lisis completa. Tras la centrifugación repetida

(Sorvall SS34, 20.000 rpm, 4 °C), se filtró el sobrenadante (0,8/0,2 µm) y se aplicó a una columna Ni-NTA (NTA: Nitriloacetato; Qiagen; Germantown, MD), equilibrada previamente con tampón de lisis. Se eliminaron las proteínas unidas de forma inespecífica en una etapa de lavado aplicando 10 volúmenes de columna en tampón de lisis. Finalmente, la proteína diana unida se eluyó con fosfato sódico 50 mM, pH 2,5, GuHCl 6,0 M, y se recogió en fracciones de 4 ml. Se registró la absorbancia a 280 nm.

La solución ácida y caotrópica resultante puede almacenarse a 4 °C para etapas de purificación adicionales o experimentos de replegamiento *in vitro*.

Partiendo de este material desplegado, pueden utilizarse con éxito diferentes métodos de replegamiento tales como la diálisis, la dilución rápida, la cromatografía de exclusión de tamaño renaturalizadora o replegamiento facilitado por matriz, llevando todos ellos virtualmente a la misma proteína soluble con un plegamiento similar a la nativa.

2.3 Renaturalización mediante diálisis y dilución rápida

Se transfiere el material, solubilizado, tal como se ha descrito más arriba, a condiciones de tampón fisiológico mediante diálisis. El valor de corte seleccionado de los tubos de diálisis fue de 4.000 – 6.000 Daltons.

Para inducir el replegamiento del ectodominio (la parte de gp41 de los dominios gp41 y FkpA unidos covalentemente), se eliminó el GuHCl de la proteína eluida mediante diálisis frente fosfato sódico 50 mM, pH 2,5, NaCl (cloruro sódico) 50 mM. Es bien conocido que el ectodominio por separado es completamente helicoidal y forma contactos terciarios a este pH extremo. Al analizar la FkpA producida de forma recombinante mediante DC-UV cercana, se observó que FkpA se halla esencialmente desestructurada bajo las mismas condiciones. Es sorprendente que el replegamiento de gp41-FkpA mediante diálisis dé lugar a un complejo de proteínas fácilmente soluble que comprende los dominios de las proteínas gp41 y FkpA unidos covalentemente. El espectro UV (figura 4) carece de luz dispersada, es decir absorción aparente por encima de los 300 nm. La luz dispersada sería indicativa de agregados, por lo tanto el espectro mostrado en la figura 4 implica que el material replegado no contiene cantidades significativas de agregados.

La espectroscopia de dicroísmo circular (DC) es el método de elección para evaluar las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas. La elipticidad en la región aromática (260-320 nm) informa sobre los contactos terciarios dentro de una proteína (es decir, la estructura globular de una proteína plegada regularmente), mientras que la elipticidad en la región amida refleja los elementos repetitivos regulares en el esqueleto de la proteína, es decir la estructura secundaria.

El espectro DC-UV cercano mostrado en la figura 5 proporciona evidencias convincentes de que el ectodominio (en el contexto de una proteína de fusión) muestra contactos terciarios similares a la proteína nativa a pH 2,5. El espectro de los dominios de las proteínas gp41/FkpA unidos covalentemente coincide prácticamente con el espectro del ectodominio por separado bajo condiciones idénticas (datos no mostrados). Se obtuvo la huella típica de gp41: un máximo de elipticidad a 290 nm, un desnivel característico a 285 nm y otro máximo a 260 nm reflejando un puente disulfuro ópticamente activo. Es importante resaltar que FkpA no contribuye en absoluto a la señal UV cercana bajo estas condiciones. De hecho, la elipticidad aromática de FkpA a pH 2,5 iguala virtualmente la línea basal (datos no mostrados).

En coincidencia con los resultados de la región UV cercana, la DC-UV lejana del constructo de fusión a pH 2,5 apunta a una molécula gp41 estructurada en gran parte. Los dos máximos a 220 nm y 208 nm constituyen, y corresponden a la huella típica de un ectodominio completamente helicoidal (figura 6). De las condiciones indicadas (fosfato sódico 50 mM, pH 2,5, NaCl 50 mM), el polipéptido de fusión FkpA-gp41 puede ser transferido fácilmente a condiciones de tampón fisiológicas mediante dilución rápida. En conclusión, tanto la DC-UV cercana como la lejana subrayan que se halla presente gp41 estructurada similar a la nativa (en el contexto de la proteína de fusión que también contiene FkpA) en forma muy conveniente. Interesantemente, observamos que puede obtenerse de forma incluso más simple un polipéptido de fusión similar al nativo del tipo SlyD(1-165)-gp41 mediante diálisis del material caotrópico (disuelto por ejemplo en GuHCl 7,0 M) frente a fosfato sódico 50 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM a temperatura ambiente. En los SEQ ID N° 7 y 8 se representan, respectivamente, las secuencias de nucleótidos de los dos constructos de fusión chaperona-gp41 que tienen un rendimiento excepcional, según la presente invención.

2.4 Renaturalización mediante cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)

Se aplicó el polipéptido gp41-FkpA desplegado (disuelto en fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, GuHCl 7,0 M) a una columna de filtración en gel Superdex 200 equilibrada con fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM. FkpA-gp41 se eluye esencialmente en tres fracciones principales: como un asociado de alto peso molecular, como una especie aparentemente hexámero y como una especie aparentemente trímero. La fracción aparentemente trímero se concentró y se evaluó su estructura terciaria en la determinación de la DC-UV cercana (figura 7).

El gráfico resultante es virtualmente una superposición de la curva a la cual la proteína portadora FkpA y la proteína diana contribuyen en una relación 1:1. De la forma más afortunada posible, gp41 muestra una estructura terciaria a

pH neutro y es solubilizada evidentemente por la chaperona unida covalentemente. En otras palabras, la chaperona FkpA parece aceptar el ectodominio gp41 de estructura similar a la nativa como sustrato y solubiliza esta proteína difícil de plegar a un pH de trabajo neutro. Por lo tanto, se cumple un requisito crucial para la producción de grandes cantidades de antígeno gp41 soluble con fines diagnósticos.

La DC-UV lejana de FkpA-gp41 a pH 7,4 (figura 8) confirma los resultados de la DC-UV cercana al mostrar la aditividad de las contribuciones de señal de FkpA y gp41, respectivamente. Como era esperable, el espectro está dominado por el ectodominio altamente helicoidal de gp41 (elipticidad máxima a 220 nm y 208 nm, respectivamente).

Los datos obtenidos con los dominios de las proteínas gp41/FkpA unidos covalentemente solubilizados a pH 7,4 bajo las condiciones mencionadas más arriba indican que FkpA y gp41 se comportan con unidades de plegamiento independientes dentro del constructo de polipéptido.

Ejemplo 3. Efecto de diferentes detergentes sobre la gp41 recombinante y el complejo FkpA -gp41 recombinante utilizados como antígenos en un inmunoensayo

3.1 Inmunoensayo de tipo competitivo

El ensayo COBAS CORE HIV Combi (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) proporciona un medio adecuado para analizar la inmunoreactividad de la gp41 recombinante. En principio, este ensayo también funciona de acuerdo con el concepto de puente de doble antígeno para detectar anticuerpos contra la gp41 del VIH. El antígeno de la fase sólida se recubre directamente. El antígeno de detección es gp41 marcada con peroxidasa que comprende, sin embargo, material gp41 solubilizado con SDS.

En los inmunoensayos para la detección del VIH, es altamente deseable que los reactivos utilizados sean fácilmente solubles y estables en un tampón de incubación que comprende concentraciones bastante altas de detergente. Dichos detergentes, por ejemplo Triton X-100® o Nonidet P-40®, se utilizan a una concentración entre el 0,1% y el 0,2% para romper las partículas virales.

Se analizaron tanto gp41 solubilizada con SDS como FkpA1-gp41 producida según se describe en el ejemplo 1, como antígenos competitivos en el ensayo COBAS CORE HIV Combi. Para ello, en lugar del tampón de incubación comercial, se utilizó un tampón compuesto por Triton X-100® 0,1% en una matriz de tampón libre de suero humano. El antígeno a analizar se co-incubó con un suero humano del que se sabía que era reactivo frente a gp41.

El antígeno gp41-FkpA, de forma dependiente de la dosis, inhibe potentemente la señal en un ensayo competitivo en el que la gp41 solubilizada con SDS es esencialmente no reactiva (figura 9). Se consigue una inhibición del 50% con una concentración de antígeno FkpA-gp41 de 0,1 µg/ml, correspondiente a una concentración molar de 2,2 nM.

Es remarcable que FkpA-gp41 retiene su excelente inmunoreactividad tras un pre-tratamiento con un tampón diluyente que contiene Triton X-100® 0,1% como detergente (detergente adyuvante) para desintegrar las membranas virales intactas en el ensayo. Ello contrasta marcadamente con el ectodominio gp41 solo (gp41 en SDS), el cual en presencia del detergente adyuvante pierde su inmunoreactividad prácticamente de forma completa (figura 9).

Fue una preocupación mayor en el desarrollo del constructo gp41-FkpA unido covalentemente que FkpA enmascarara epítomos cruciales debido a una dinámica de unión insuficiente o que el detergente inherente al ensayo Triton X-100 destruyera el rendimiento del ensayo induciendo la agregación del antígeno gp41. Los resultados experimentales de muchos ensayos de competición en la plataforma COBAS CORE proporcionan evidencias convincentes de que los epítomos cruciales de gp41 son bien accesibles en el contexto de los dominios de las proteínas unidos covalentemente. Además, se retiene la inmunoreactividad de gp41 dentro del complejo chaperona-gp41 intramolecular en presencia de detergentes adyuvantes como el Triton X-100.

3.2 Ensayo de electroquimioluminiscencia

Los inmunoensayos, según el formato del puente de doble antígeno, tienen grandes ventajas en el diagnóstico serológico de agentes infecciosos. Dado que FkpA-gp41, según la presente invención, es soluble en condiciones de tampón fisiológicas, ha sido posible investigar si el material es adecuado para ser utilizado en un ensayo de puente de doble antígeno utilizando la electroquimioluminiscencia como principio de detección.

Los intentos de acoplar gp41 solubilizada con SDS a marcadores de rutenio no han tenido éxito. Sin embargo, dado que FkpA-gp41 es fácilmente soluble bajo condiciones de tampón fisiológicas, el acoplamiento de este material a marcadores Ru hidrofóbicos fue sencillo. Debe resaltarse que incluso el complejo diana-chaperona modificado del modo descrito sigue siendo soluble. Para realizar el ensayo en el sistema de ensayo Elecsys® (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), FkpA-gp41 se biotiniló y ruteniló, respectivamente, y se analizó su inmunoreactividad en un ensayo de puente de doble antígeno.

Varios sueros anti-VIH representativos que contienen principalmente anticuerpos IgG (inmunoglobulina G) dieron un valor altamente positivo con los dominios de las proteínas FkpA-gp41 unidos covalentemente. También se ha observado que la señal de fondo se acerca al fondo intrínseco del aparato, incluso a concentraciones de antígeno de hasta 500 ng/ml. La relación entre señal y ruido de fondo resultó ser excelente. Además, no existen evidencias de que la proteína portadora, la chaperona molecular FkpA de *E. coli* provoque la unión no específica de los anticuerpos contenidos en estos sueros humanos.

Tal como se ha comentado más arriba, la detección precoz de la seroconversión es crucial para el diagnóstico fiable del VIH. Durante el curso de la infección, aparecen primero los anticuerpos IgM. Para detectar la infección de forma fiable en una fase muy precoz, es por lo tanto obligatorio diseñar un módulo de antígenos con una elevada densidad de epítomos para el reconocimiento y unión a IgM. De hecho, FkpA-gp41 es bien reconocido por el suero anti-VIH del tipo IgM típico. Lo que es más importante es el hecho de que las muestras que es difícil que den un resultado positivo, como los sueros B y C de los paneles de seroconversión 9003 y 4009 suministrados por NABI (Miami, Florida), dan positivo con el constructo de fusión, según la presente invención. Este es un logro importante dado que los antígenos gp41 en forma de péptido no son reactivos en absoluto cuando se ensayan con estos suero IgM.

Ejemplo 4. Los complejos chaperona-gp41 solubles inhiben la entrada de virus

Se evaluó la capacidad de diferentes proteínas de fusión gp41-chaperona para inhibir la fusión de membranas mediada por VIH-1 en un ensayo *in vitro*. En resumen, se infectaron líneas celulares informadoras MAGI P4-CCR5 que expresan CD4, CCR5 y CXCR4 con la cepa VIH-1 NL4-3 y se evaluó la actividad β -galactosidasa dependiente de Tat según Meister y otros, *Virology* (2001) 284(2), 287-296. De hecho, observamos una inhibición substancial de la infección con valores IC_{50} en el rango nM. Por ejemplo SlyD-gp41 (ver SEQ ID N° 6) inhibe la entrada de virus de forma significativa con una IC_{50} menor a 70 nM.

En conclusión, el complejo intramolecular soluble que comprende gp41 de VIH-1 o gp36 de VIH-2, respectivamente, y una chaperona peptidil-prolil-isomerasa posee propiedades excelentes respecto a la solubilidad e integridad conformacional que permiten el diseño de ensayos de anticuerpos anti-VIH mejorados y otras aplicaciones comerciales.

Ejemplo 5. La fusión de la chaperona FkpA al ectodominio gp36 da lugar a un polipéptido citoplasmático que puede replegarse fácilmente *in vitro*.

Para obtener gp36, el homólogo en VIH-2 de gp41, en forma soluble e inmunológicamente activa, clonamos un constructo denominado FF36. Este polipéptido de fusión comprende dos unidades FkpA y una unidad gp36, unidas entre sí por un tramo flexible rico en glicinas. Para facilitar la purificación, el constructo de fusión se etiquetó con His₆ en el extremo C-terminal. La proteína se purificó esencialmente, según el protocolo previamente descrito: tras la lisis caotrópica, la proteína se unió a una columna Ni-NTA y se eluyó, tras un lavado en exceso con fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, GuHCl 7,0 M, disminuyendo el pH. A continuación, se replegó la proteína eluida pasándola a través de una columna de filtración en gel equilibrada con fosfato sódico 50 mM pH 7,8, cloruro sódico 100 mM, EDTA 1 mM. La proteína nativa resultante de este método de "filtración en gel renaturalizante" muestra unas propiedades inmunológicas y espectroscópicas satisfactorias (ver figura 10), que se corresponden con las entidades homólogas de gp41, tales como F41 y FF41. Se realizó el protocolo de purificación y replegamiento descrito en la presente invención con FF36 con 3 mutaciones puntuales en la región de repeticiones heptad N-terminal de gp36 (para la secuencia ver SEQ ID N° 9). También se aplicó con éxito el mismo protocolo a un constructo de fusión con el ectodominio gp36 salvaje, aunque con rendimientos de proteína soluble inferiores.

Ejemplo 6. Puede obtenerse de forma adecuada y reproducible FkpA-gp21 inmunoreactiva y soluble.

Se cultivaron, se indujeron y recolectaron células *E. coli* con sobreproducción de FkpA-gp21 (comprendiendo el SEQ ID N° 10), tal como se ha descrito previamente. Para la lisis completa, los sedimentos celulares se agitaron en fosfato sódico 50 mM pH 7,8, GuHCl 7,0 M a temperatura ambiente durante 1 hora. El lisado celular caotrópico se aplicó a una columna Ni-NTA equilibrada previamente en tampón de lisis. Tras la etapa de lavado se eluyó la proteína diana (que lleva un marcado Hexa-His C-terminal) disminuyendo el pH. Para el replegamiento, se pasó FkpA-gp21 (almacenada en fosfato sódico 50 mM pH 6,0, GuHCl 7,0 M a 4 °C) a través de una columna de filtración en gel Superdex 200 equilibrada previamente con fosfato sódico 50 mM pH 7,8, cloruro sódico 100 mM. Los espectros UV demostraron que FkpA-gp21 se eluye como una proteína soluble la cual, en comparación con la gp21 sin chaperona, deja de ser tendente a la agregación (figura 11/1). Además, la FkpA-gp21 resultante muestra una actividad inmunológica excelente cuando se evalúa en un experimento competitivo tipo COBAS CORE (figura 11/2).

Ejemplo 7. Fusión de una subunidad FkpA adicional a FkpA-gp41 mejora las propiedades inmunológicas del ectodominio gp41.

Abordamos la cuestión de si una subunidad PPlasa adicional dentro del contexto del polipéptido de fusión mejoraría las propiedades globales del complejo ectodominio gp41-chaperona. Con este fin, preparamos F41 (un dominio

FkpA situado por encima de la variante de gp41) y FF41 (dos dominios FkpA situados por encima de la variante de gp41) según el protocolo descrito. A continuación se evaluaron las proteínas de fusión biotiniladas y ruteniladas en el sistema Elecsys® E2010. Los resultados son un fuerte indicador de las propiedades mejoradas del constructo FF41, que contiene un dominio de chaperona adicional.

Se observó que las señales de ruido de fondo con sueros negativos, que son decisivas para la relación entre señal y ruido de fondo y la determinación fiable de sueros con títulos bajos, se reducían más de un cincuenta por ciento cuando FF41 (aproximadamente 1.600 cuentas) se comparaba con F41 (aproximadamente 3.800 cuentas).

Tabla 1: Comparación de F41 y FF41

	F41	FF41
R1:	EMHR220	EMHR221
ESS en R1	F-41-Bi(UE)25	FF-41-Bi-UEEK
β(AL)	500ng/ml	750ng/ml
R2	EMHR221	EMHR222
ESS en R2	F-41-Ru(UE)25	FF41-2Ru-SK(4)
β(AL)	500ng/ml	750ng/ml
Media de cuentas con 7 sueros negativos	3.768	1.589

Se obtuvieron resultados positivos similares con una proteína de fusión SS41, es decir una proteína de fusión que contiene dos dominios SlyD y un dominio gp41 en posición C-terminal respecto a los dominios chaperona.

Listado de referencias

- Aslam, M. y Dent, A., The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation" (1998) 216-363, Eds. M. Aslam y A. Dent, McMillan Reference, London
- Bardwell, J. C., Mol Microbiol 14 (1994) 199-205
- Beissinger, M. y Buchner, J., Biol. Chem. 379 (1998) 245-59
- Bothmann, H. y Pluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17100-5
- Braden, B. C. y Poljak, R. J., Faseb J 9 (1995) 9-16
- Buchner, J., Faseb J 10 (1996) 10-19
- Butler, J. E., y otros, J. Immunol. Methods 150 (1992) 77-90
- Caffrey, M., y otros, J Biol Chem 275 (2000) 19877-82
- Chan, D. C., y otros, Cell 89 (1997) 263-73
- Crooke, E. y Wickner, W., Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987) 5216-20
- Danese, P. N., y otros, Genes Dev 9 (1995) 387-98
- Dartigalongue, C. y Raina, S., Embo J17 (1998) 3968-80
- Doms, R. W. y Moore, J. P., J Cell Biol 151 (2000) F9-14
- Egan, D. A., y otros, Biochemistry 32 (1993) 1920-7
- Fischer, G., y otros, Nature 337 (1989) 476-8
- Frech, C., y otros, Embo J 15 (1996) 392-98
- Gething, M. J. y Sambrook, J., Nature 355 (1992) 33-45
- Guyader, M., y otros, Nature 326 (1987) 662-9
- Hottenrott, S., y otros, J Biol Chem 272 (1997) 15697-701
- Kay, J. E., Biochem J 314 (1996) 361-85
- Lane, W. S., y otros, J Protein Chem 10 (1991) 151-60
- Lu, M., y otros, Nat. Struct. Biol. 2 (1995) 1075-82
- Meister, S., y otros, Virology 284 (2001) 287-96
- Missiakas, D., y otros, Embo J 14 (1995) 3415-24
- Missiakas, D., y otros, Mol Microbiol 21 (1996) 871-84
- Prusiner, S. B., Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 13363-83
- Rahfeld, J. U., y otros, FEBS Lett 352 (1994) 180-4
- Ramm, K. y Pluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17106-13
- Ratner, L., y otros, Nature 313 (1985) 277-84
- Root, M. J., y otros, Science 291 (2001) 884-8
- Schmid, F. X., Molecular chaperones in the life cycle of proteins in "-" (1998) 361-389, Eds. A. L. Fink and Y. Goto, Marcel Decker In., New York
- Scholz, C., y otros, Embo J 16 (1997) 54-8
- Scholz, C., y otros, J Biol Chem 271 (1996) 12703-7
- Stoller, G., y otros, Embo J 14 (1995) 4939-48
- Tijssen, in "Methods in Enzymology" (1980), Eds. S. P. Colowick, N. O. Caplan and S. P., Academic Press
- Tijssen, P., Preparation of enzym-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates in "Practice and theory of enzyme immunoassays" (1990) 221-278, Eds. R. H. Burdon and v. P. H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam
- Wang, C. C. y Tsou, C. L., Faseb J 7 (1993) 1515-7
- Wild, C., y otros, Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 10537-41

Wingfield, P. T., y otros, Protein Sci 6 (1997) 1653-60
Winter, J., y otros, Journal of Biotechnology 84 (2000) 175-185
Zarnt, T., y otros, J Mol Biol 271 (1997) 827-37

- 5 AU 597884
EP 0280211
EP 396 559
US 4,735,896
US 4,879,212
- 10 WO 92/22573
WO 93/21346
WO 94/08012
- 15 Listado de secuencias
- <110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG
- 20 <120> Complejo soluble que comprende una glicoproteína de superficie retroviral
- <130> 19290WO-WN
- <140>
25 <141>
- <150> EP01115225.3
<151> 2001-06-22
- 30 <150> EP01120939.2
<151> 2001-08-31
- <160> 10
- 35 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 147
<212> PRT
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: corresponde a las posiciones 535 a 681 de la proteína de envoltura del VIH-1
- 45 <400> 1

ES 2 391 623 T3

Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln
 1 5 10 15
 Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu
 20 25 30
 Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala
 35 40 45
 Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys
 50 55 60
 Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp
 65 70 75 80
 Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu
 85 90 95
 Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile
 100 105 110
 Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu
 115 120 125
 Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp
 130 135 140
 Leu Trp Tyr
 145

5 <210> 2
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: corresponde a las posiciones 534 a 676 de la proteína de envoltura del VIH-2

<400> 2

ES 2 391 623 T3

Leu Thr Val Ser Ala Gln Ser Arg Thr Leu Leu Ala Gly Ile Val Gln
 1 5 10 15
 Gln Gln Gln Gln Leu Leu Asp Val Val Lys Arg Gln Gln Glu Leu Leu
 20 25 30
 Arg Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Asn Leu Gln Ala Arg Val Thr Ala
 35 40 45
 Ile Glu Lys Tyr Leu Gln Asp Gln Ala Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys
 50 55 60
 Ala Phe Arg Gln Val Cys His Thr Thr Val Pro Trp Val Asn Asp Ser
 65 70 75 80
 Leu Ala Pro Asp Trp Asp Asn Met Thr Trp Gln Glu Trp Glu Lys Gln
 85 90 95
 Val Arg Tyr Leu Glu Ala Asn Ile Ser Lys Ser Leu Glu Gln Ala Gln
 100 105 110
 Ile Gln Gln Glu Lys Asn Met Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asn Ser Trp
 115 120 125
 Asp Ile Phe Gly Asn Trp Phe Asp Leu Thr Ser Trp Val Lys Tyr
 130 135 140

5 <210> 3
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial:cebador1
 10 <400> 3
 gcgggtgttc cgggtatccc accgaattc 29
 15 <210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial:cebador2
 <400> 4
 gaattcgggtg ggatacccg g aacaccgc 29
 25 <210> 5
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial:cebador3
 <400> 5

ES 2 391 623 T3

cgggatccgg tggcggttca ggcggtggct ctgggtggcgg tacgctgacg gtacaggcca 60
g 61

5 <210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:cebador 4

<400> 6
ccgctcgagg taccacagcc aatttggtat 30

15 <210> 7
<211> 1269
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:codificación de la proteína de fusión FkpA-gp41

<400> 7

```

atggctgaag ctgcaaaacc tgctacaact gctgacagca aagcagcgtt caaaaatgac 60
gatcagaaat cagcttatgc actgggtgct tcgctgggtc gttacatgga aaactctctt 120
aaagaacaag aaaaactggg catcaaactg gataaagatc agctgatcgc tgggtgttcag 180
gatgcatttg ctgataagag caaactctcc gaccaagaga tcgaacagac tctgcaagca 240
ttcgaagctc gcgtgaagtc ttctgctcag gcgaagatgg aaaaagacgc ggctgataac 300
gaagcaaaag gtaaagagta ccgcgagaaa ttgccaag agaaaggtgt gaaaacctct 360
tcaactggtc tggtttatca ggtagtagaa gccggtaaag gcgaagcacc gaaagacagc 420
gatactgttg tagtgaacta caaaggtacg ctgatcgacg gtaaagagtt cgacaactct 480

```

```

tacaccctg gtgaaccgct ctctttccgt ctggacggtg ttatcccggg ttggacagaa
540
ggtctgaaga acatcaagaa aggcggtaag atcaaactgg ttattccacc agaactggct 600
tacggcaaag cgggtgttcc gggatatcca ccgaattcta ccctggtggt tgacgtagag 660
ctgctggatg tgaaccagc gccgaaggct gatgcaaagc cggaagctga tgcgaaagcc 720
gcagattctg ctaaaaaagg tggcggttcc ggcggtggct ctgggtggcgg atccggtggc 780
ggttccggcg gtggtctctg tggcggtaag ctgacgggtac aggccagaca attattgtct 840
ggtatagtgc agcagcagaa caatgagctg agggctattg aggcgcaaca gcatctggag 900
caactcacag tctggggcac caagcagctc caggcaagag aactggctgt gaaagatac 960
ctaaaggatc aacagctcct ggggatttgg ggttgcctctg gaaaactcat ttgcaccact
1020
gctgtgcctt ggaatgctag ttggagtaat aatctctctg aacagatttg gaataacatg
1080
acctggatgg agtgggacag agaaattaac aattacacaa gcttaataca ttccttaatt
1140
gaagaatcgc aaaaccagca agaaaagaat gaacaagaat tattggaatt agataaatgg
1200
gcaagtttgt ggaattgggt taacataaca aattggctgt ggtacctega gcaccaccac
1260
caccaccac
1269

```

25 <210> 8
<211> 1026
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

ES 2 391 623 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:codificación de la proteína de fusión SlyD-gp41

5 <400> 8
atgaaagtag caaaagacct ggtggtcagc ctggcctatc aggtacgtac agaagacggt 60
gtgttggttg atgagtctcc ggtgagtgcg ccgctggact acctgcatgg tcacggttcc 120
ctgatctctg gcctggaaac ggcgctggaa ggtcatgaag ttggcgacaa atttgatgtc 180
gctgttggcg cgaacgacgc ttacggtcag tacgacgaaa acctggtgca acgtgttcct 240
aaagacgtat ttatgggctg tgatgaactg caggtaggta tgcgtttcct ggctgaaacc 300
gaccagggtc cggtagcggg tgaaatcact gcggttgaag acgatcacgt cgtggttgat 360
ggaaccaca tgctggccgg tcagaacctg aaattcaacg ttgaagttgt ggcgattcgc 420
gaagcgactg aagaagaact ggctcatggt cacgttcacg gcgcgcacga tcaccaccac 480
gatcacgacc acgacgggtg cggttccggc ggtggctctg gtggcggtac cggtagcggg 540
tccggcgggtg gctctgggtg cggtagcctg acggtacagg ccagacaatt attgtctggt 600
atagtgcagc agcagaacaa tgagctgagg gctattgagg cgcaacagca tctggagcaa 660
ctcacagtct ggggcaccaa gcagctccag gcaagagAAC tggctgtgga aagataccta 720
aaggatcaac agctcctggg gatattgggg ttgctctggaa aactcatttg caccactgct 780
gtgccttggg atgctagttg gagtaataaa tctctggAAC agatttggaa taacatgacc 840
tggatggagt gggacagaga aattaacaat tacacaagct taatacattc ctttaattgaa 900
gaatcgcaaa accagcaaga aaagaatgaa caagaattat tgggaattaga taaatgggca 960
agtttgtgga attggtttaa cataacaaat tggctgtggt acctcgagca ccaccaccac
1020
caccac
1026

<210> 9

<211> 688

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:proteína de fusión FkpAFkpAgp36 (3mut)

15

<400> 9

ES 2 391 623 T3

Met Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala Thr Thr Ala Asp Ser Lys Ala Ala
1 5 10 15

Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu
20 25 30

Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile
35 40 45

Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala
50 55 60

Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala
65 70 75 80

Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp
85 90 95

Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala
100 105 110

Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val
115 120 125

Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val
130 135 140

Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser
145 150 155 160

Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro
165 170 175

Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys
180 185 190

Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly
195 200 205

Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val
210 215 220

Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala
225 230 235 240

Ala Asp Ser Ala Lys Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

ES 2 391 623 T3

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Glu Ala
260 265 270

Ala Lys Pro Ala Thr Thr Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp
275 280 285

Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met
290 295 300

Glu Asn Ser Leu Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys
305 310 315 320

Asp Gln Leu Ile Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys
325 330 335

Leu Ser Asp Gln Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg
340 345 350

Val Lys Ser Ser Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn
355 360 365

Glu Ala Lys Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly
370 375 380

Val Lys Thr Ser Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly
385 390 395 400

Lys Gly Glu Ala Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys
405 410 415

Gly Thr Leu Ile Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly
420 425 430

Glu Pro Leu Ser Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu
435 440 445

Gly Leu Lys Asn Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro
450 455 460

Pro Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn
465 470 475 480

Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro
485 490 495

Lys Ala Asp Ala Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala
500 505 510

Lys Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
515 520 525

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Leu Thr Val Ser Ala Gln Ser
530 535 540

Arg Thr Leu Leu Ala Gly Ile Val Gln Gln Gln Gln Gln Glu Leu Asp

REIVINDICACIONES

- 5 1. Inmunoensayo, según el concepto de puente de doble antígeno, que comprende: un primer antígeno que comprende un primer complejo chaperona-antígeno y un segundo antígeno que comprende un segundo complejo chaperona-antígeno, en el que dichos antígenos son proteínas amiloidogénicas y en el que dichas chaperonas son seleccionadas del grupo que consiste en SlyD y FkpA.
- 10 2. Inmunoensayo, según la reivindicación 1, en el que la primera chaperona y la segunda chaperona son moléculas distintas derivadas de una especie.
- 15 3. Inmunoensayo, según la reivindicación 1, en el que la primera chaperona y la segunda chaperona son derivadas de diferentes especies.
- 15 4. Inmunoensayo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la primera chaperona es derivada de una bacteria termofílica.
- 20 5. Inmunoensayo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la segunda chaperona es derivada de una bacteria termofílica.
- 20 6. Inmunoensayo, según la reivindicación 1 ó 3, en el que la primera chaperona y la segunda chaperona son derivadas de bacteria termofílicas.
- 25 7. Inmunoensayo, según la reivindicación 1, en el que el primer complejo de antígeno comprende un grupo de unión en fase sólida.
- 25 8. Inmunoensayo, según la reivindicación 1, en el que el segundo complejo de antígeno comprende un grupo marcador.

Figura 1A

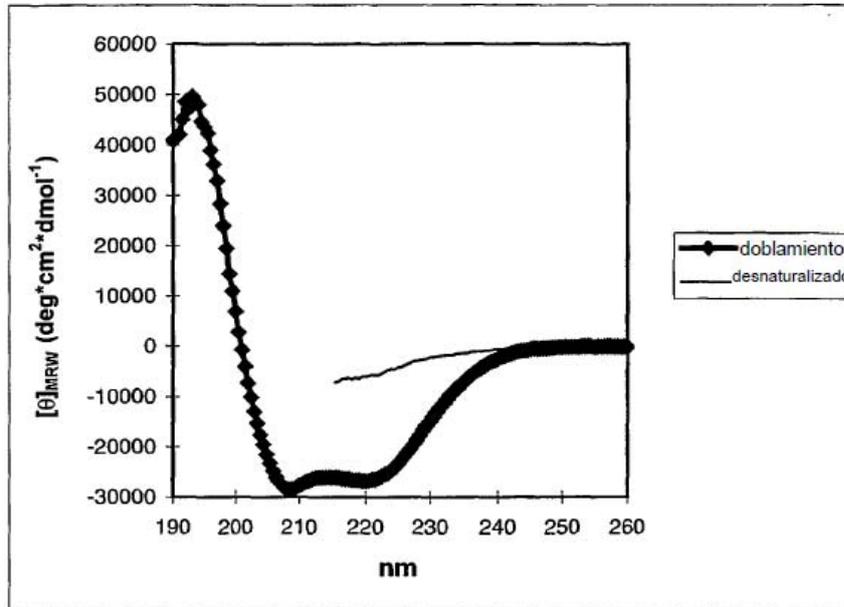


Figura 1B

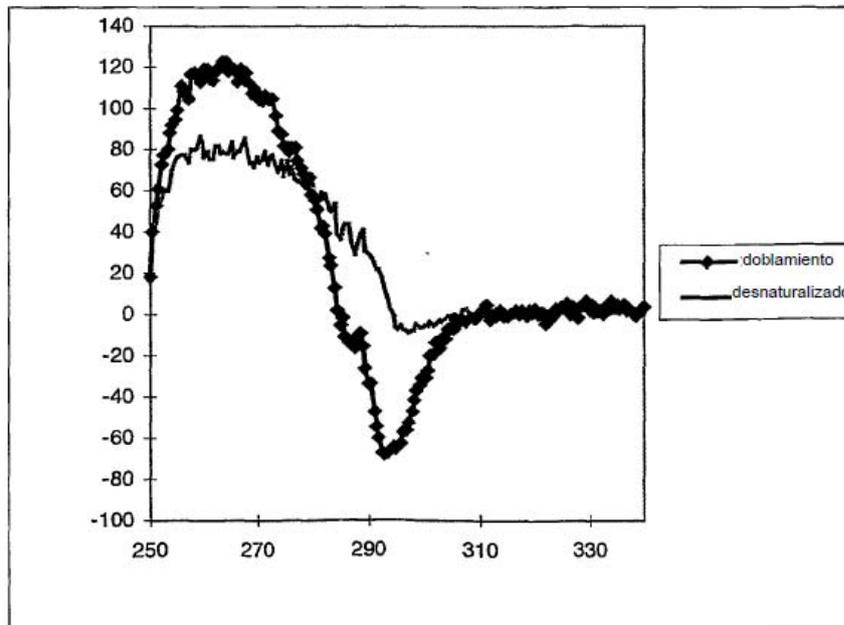


Figura 2

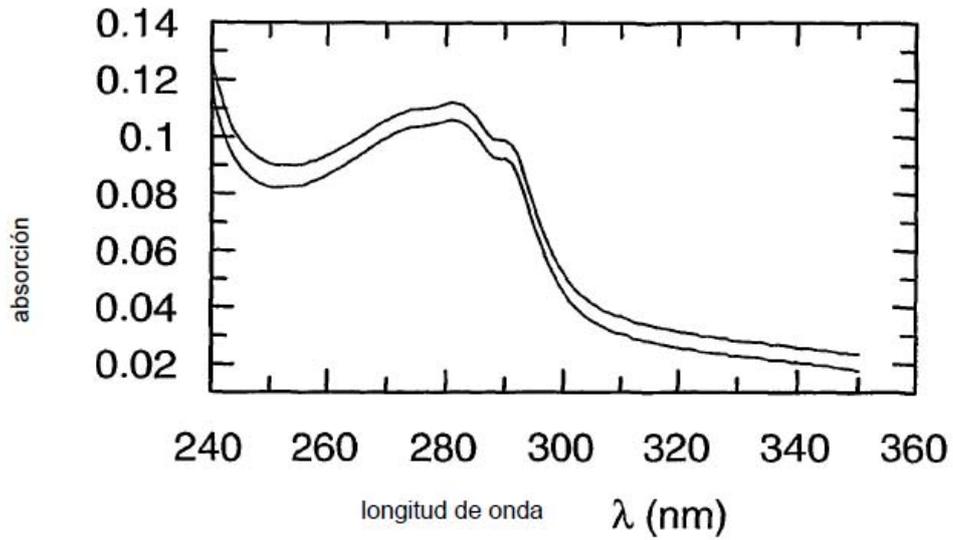


Figura 3A

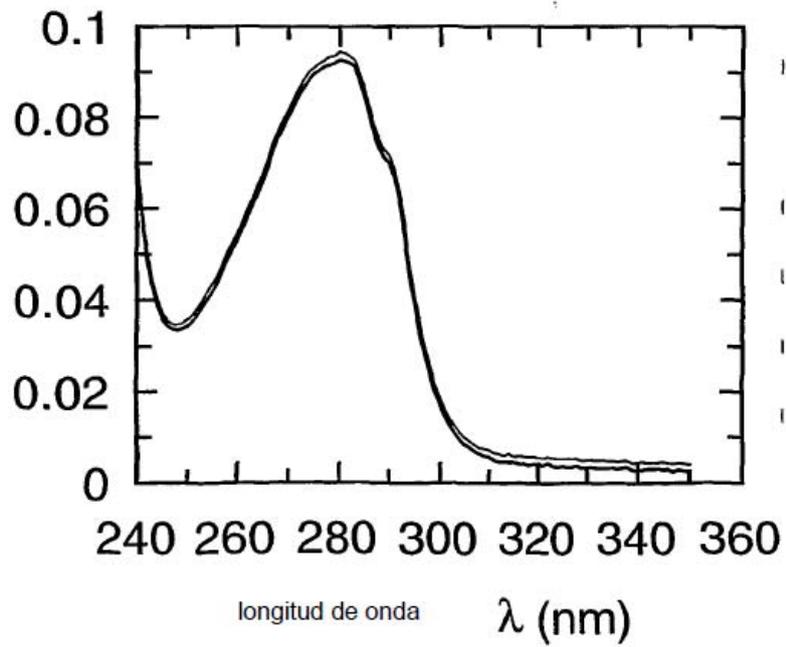


Figura 3B

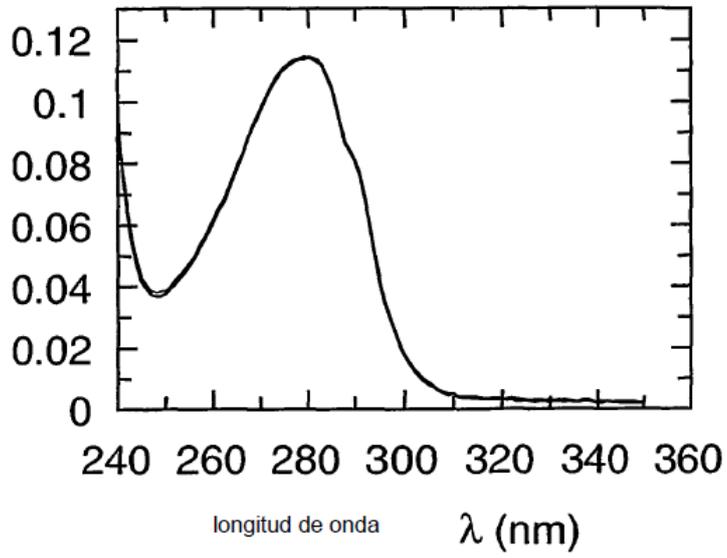


Figura 4

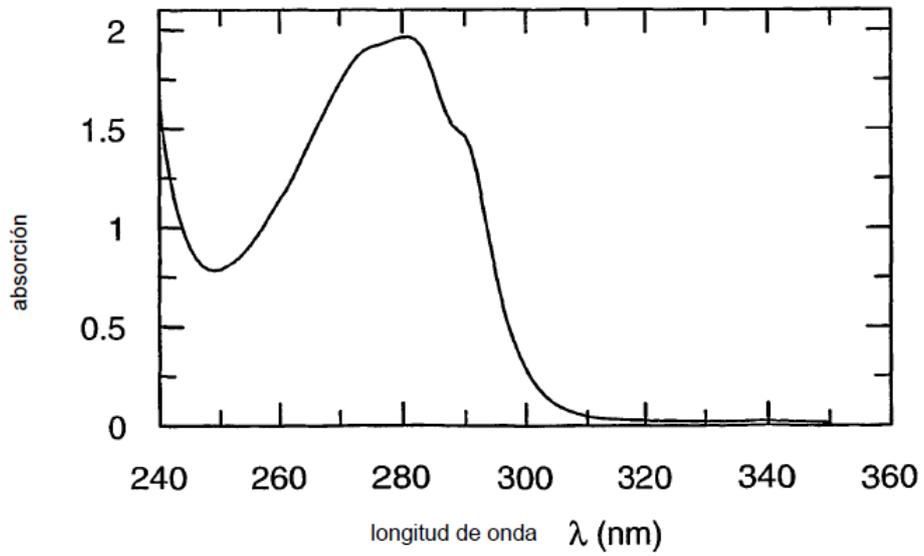


Figura 5

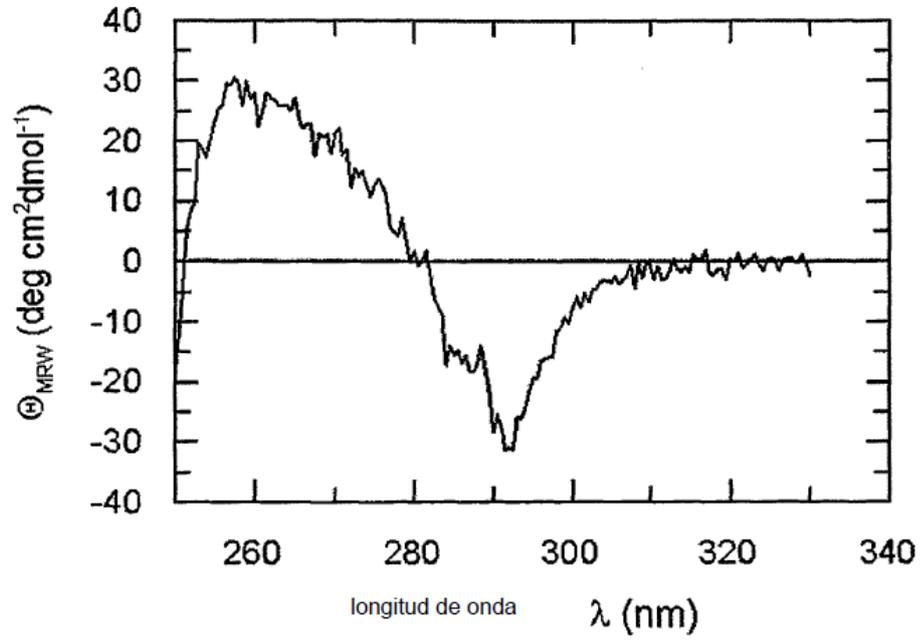


Figura 6

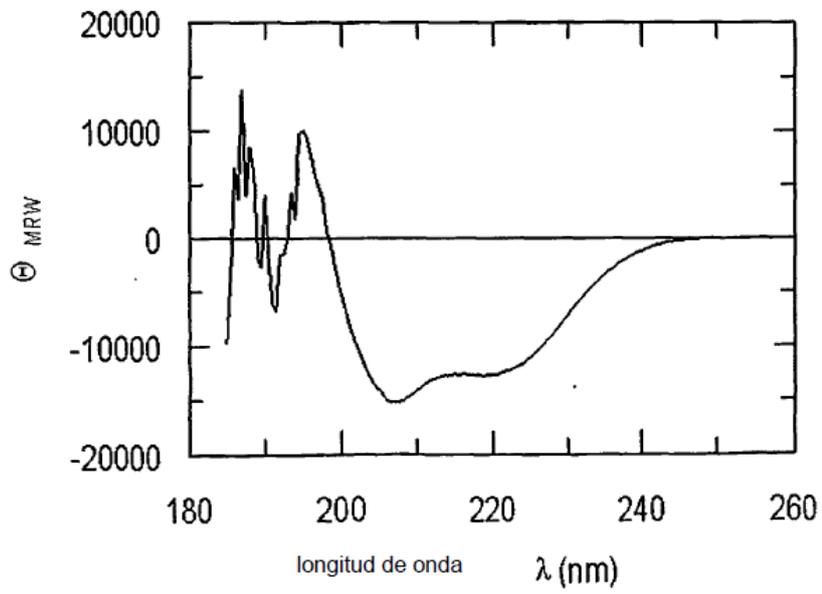


Figura 7

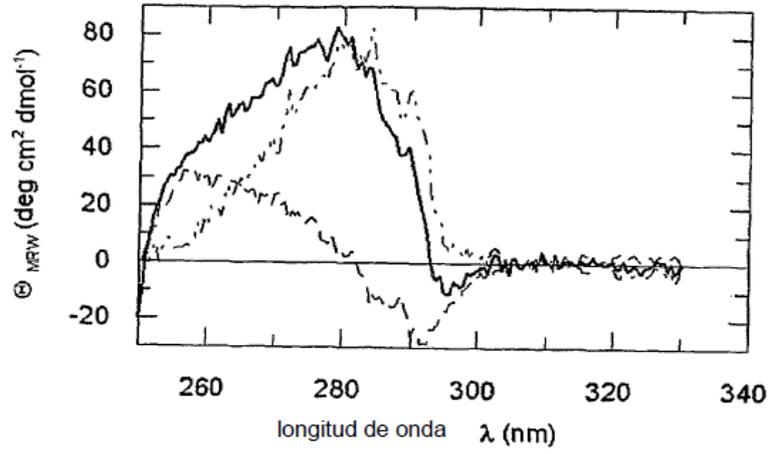


Figura 8

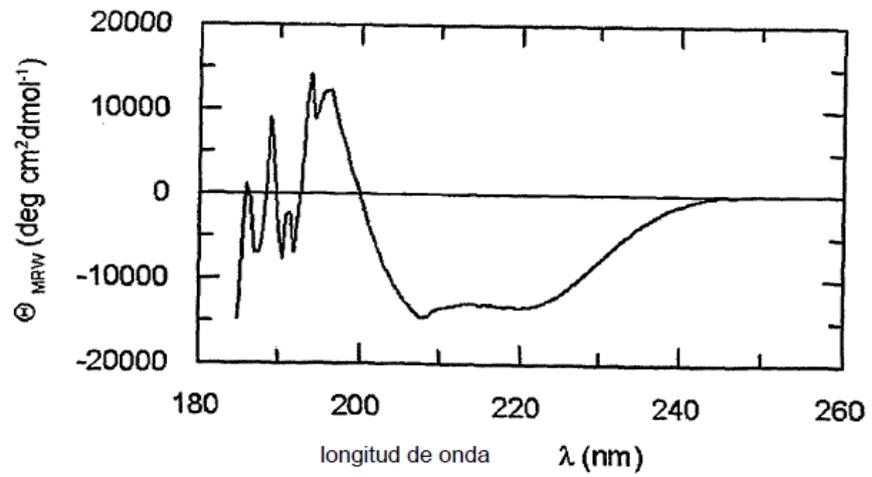


Figura 9

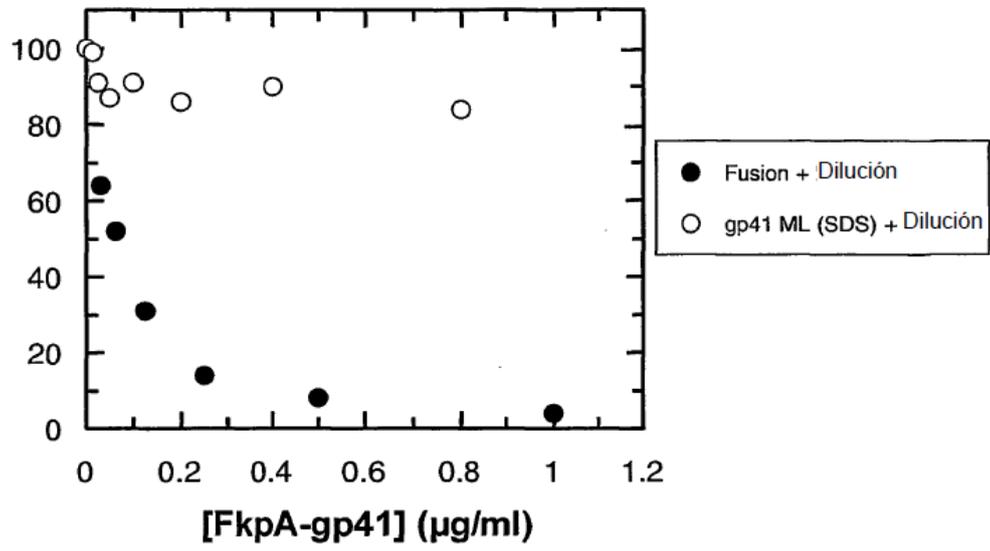


Figura 10

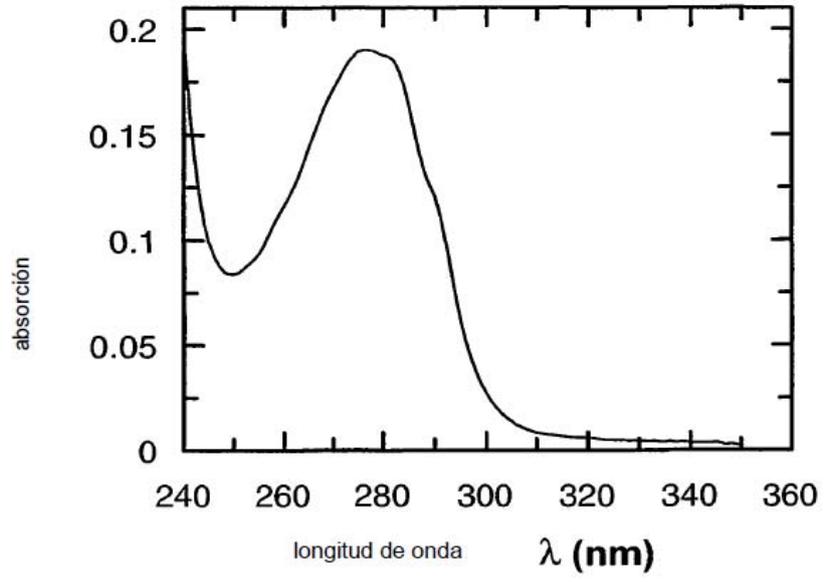


Figura 11/1

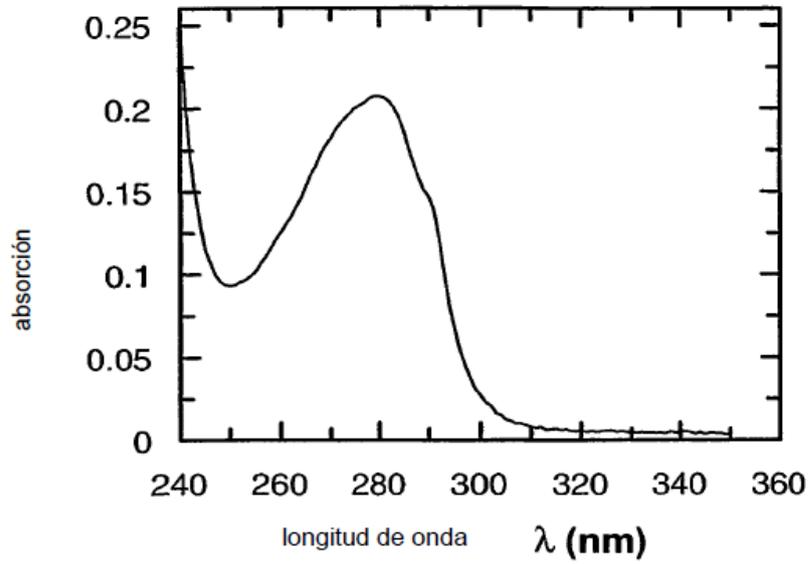


Figura 11/2

