

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 848**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/20 (2006.01)

C12N 9/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2004 E 04805124 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 1724281**

54 Título: **Composiciones y métodos para detección de infección patógena**

30 Prioridad:

23.12.2003 EP 03380307

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

04.06.2013

73 Titular/es:

**BIOKIT S.A. (100.0%)
CAN MALE S/N
08186 LLICA D'AMUNT, BARCELONA, ES**

72 Inventor/es:

**BERTHET, FRANÇOIS XAVIER;
VAYREDA CASADEVALL, FRANCESC;
SANZ, MARÍA CRUZ;
LLOP GARCIA, TERESA y
MOR OLLE, ANGELS**

74 Agente/Representante:

TORO GORDILLO, Francisco Javier

ES 2 405 848 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

Composiciones y métodos para detección de infección patógena

5 Campo de la invención

La presente invención presenta en general composiciones y métodos de diagnóstico derivados de la caracterización de la unión de un polipéptido de lisozima con un polipéptido P17 de *Treponema pallidum* (Tp17) o polipéptidos de tipo Tp17. Además, la invención proporciona métodos y composiciones para aumentar o reducir la unión entre una lisozima y un TP-17 o un polipéptido de tipo TP-17.

Antecedentes de la invención

La sífilis es una enfermedad provocada por infección por *Treponema pallidum* (denominado en lo sucesivo en el presente documento también "Tp"). El diagnóstico de la sífilis se realiza en general por un inmunoensayo de anticuerpo anti-Tp en la sangre usando, por ejemplo, el ensayo de Hemaglutinación de *Treponema pallidum* (TPHA), el Ensayo de Absorción de Anticuerpo de *Treponema* Fluorescente (FTA-ABS) y/o el Ensayo de Inmovilización de *Treponema pallidum* (TPI), así como sistemas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y transferencia de western. Estos ensayos detectan anticuerpos que reaccionan con Tp o preparaciones de antígeno de Tp, tales como los antígenos de Tp, Tp15, Tp17 y Tp47, por ejemplo. El ensayo de TPI implica una evaluación microscópica del grado en que los anticuerpos activadores de complemento en el suero de un paciente inhiben la movilidad de Tp. Este ensayo no se usa en general como un diagnóstico debido a su alto coste. El ensayo de TPHA implica aglutinación de anticuerpos de suero del paciente con eritrocitos a los que se une el antígeno sonicado de Tp. El ensayo de FTA-ABS implica microscopía de inmunofluorescencia indirecta para detectar la unión de anticuerpos específicos en el suero del paciente con Tp unido a un soporte sólido mediante un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Aunque estos ensayos se usan ampliamente, carecen de la sensibilidad requerida para detectar infección de etapa temprana o nivel bajo, cuando los niveles de anticuerpo de Tp en los fluidos corporales son muy bajos.

Además, el uso popular de antígenos de Tp purificados o recombinantes individuales en inmunoensayos existentes para sífilis no explica la unión de algunos anticuerpos con complejos formados entre antígenos de Tp y otros antígenos (es decir, compañeros de unión de antígeno de Tp) normalmente presentes en el fluido corporal del sujeto. Por lo tanto los inmunoensayos existentes no detectan tales anticuerpos en ausencia del compañero de unión de antígeno de Tp, lo que da como resultado en algunos casos baja sensibilidad o resultados de ensayo de falso negativo. Existe por lo tanto la necesidad de ensayos de diagnóstico de patógenos con sensibilidad mejorada, que detecten anticuerpos que se unen a complejos de compañero de unión/antígeno patógeno.

Sumario de la invención

La invención proporciona composiciones y métodos para la detección de una infección por patógeno. La invención se refiere en general al descubrimiento de que el polipéptido de *Treponema pallidum*, Tp17, se une a lisozima, un péptido antimicrobiano producido por el hospedador, e inhibe la actividad antimicrobiana de la lisozima. Se identificaron el sitio de unión en Tp17 para lisozima y el sitio de unión en lisozima para Tp17. Las comparaciones de secuencias de Tp17 requeridas para la unión e inhibición de lisozima con proteínas relacionadas posibilitaron la identificación de secuencias consenso de unión a lisozimas que están conservadas entre muchos patógenos diferentes, incluyendo virus de herpes simple, lo que sugiere que la unión del polipéptido relacionado con Tp17 con lisozima proporciona un mecanismo general para inhibir una respuesta inmune del hospedador. En consecuencia, la invención también posibilita la identificación de polipéptidos de lisozimas mutantes que contienen mutaciones que interfieren con o desestabilizan la unión de TP17. Tales polipéptidos, o fragmentos de los mismos, son útiles en la prevención o tratamiento de una infección patógena. Además, la invención posibilita ensayos de diagnóstico mejorados basados en la detección de anticuerpos que se unen a un complejo de Tp17-lisozima.

La identificación de un motivo de unión a lisozima en Tp17, así como la identificación de secuencias consenso de motivo de unión a lisozimas compartidas por otras proteínas derivadas de patógenos, también proporciona composiciones y métodos útiles para la detección o inhibición de lisozima, así como la detección de patógenos específicos e inhibición de las infecciones correspondientes además de sífilis. Además, los polipéptidos derivados de patógeno son útiles en el diagnóstico, profilaxis y tratamiento de varias enfermedades, incluyendo enfermedades relacionadas con actividad lisozima aberrante. Esos polipéptidos también proporcionan un marcador de afinidad útil para su uso en la purificación de proteínas usando cromatografía de afinidad de lisozima económica.

En un aspecto, la invención generalmente presenta un método como se describe en la reivindicación 1. En aspectos relacionados, la invención presenta método, kits y composiciones como se definen en las reivindicaciones 2 a 34.

Se describen en el presente documento polipéptidos de lisozima mutante sustancialmente puros que contienen al menos una mutación de un aminoácido que reduce la unión entre el polipéptido de lisozima mutante y un polipéptido

de tipo Tp17 (por ejemplo, reduce la unión en 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 85% o 95% en relación con la unión natural), en el que el polipéptido de lisozima mutante conserva al menos el 50%, 60%, 75%, 85% o 95% de la actividad antimicrobiana de un polipéptido de lisozima natural correspondiente. La mutación puede reducir la unión entre el polipéptido de lisozima mutante y un polipéptido de tipo Tp17 en al menos 5% en relación con la unión del polipéptido de lisozima natural, o la mutación afecta a una carga de superficie en el polipéptido natural correspondiente. La mutación puede ser en un resto de aminoácido cargado positivamente, en un resto de aminoácido cargado negativamente, o en un resto de aminoácido hidrófobo de un polipéptido de lisozima natural que entra en contacto con un polipéptido de tipo Tp17. La mutación puede ser de al menos uno, dos, tres, cuatro o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Lys19, Arg23, Lys51, Gly55, Asn57, Arg131, Asn132 y Arg133 de lisozima humana o puede estar presente en una posición correspondiente en una lisozima derivada de otra especie (por ejemplo, procariota, eucariota, mamífero).

También se describen en el presente documento moléculas de ácido nucleico sustancialmente puras que codifican los polipéptidos de lisozima anteriormente mencionados, un vector que contiene dicha molécula de ácido nucleico, y una célula huésped que contiene este vector.

Como se describe en el presente documento, el polipéptido de lisozima puede ponerse en contacto con el polipéptido de tipo Tp17 antes de, durante, o después de entrar en contacto con la muestra biológica. En diversas realizaciones, el ensayo es un inmunoensayo (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima ELISA), transferencia de Western, ensayo de inmunoaglutinación, radioinmunoensayo, ensayo turbidimétrico, ensayo nefelométrico, ensayo inmunocromatográfico, ensayo quimioluminiscente y ensayo fluorescente). En otras realizaciones, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, lágrimas, saliva, esputo, líquido nasal, líquido ótico, líquido genital, líquido mamario, leche, calostro, líquido placentario, sudoración, líquido sinovial, líquido ascítico, líquido gastrointestinal, exudado, trasudado, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, bilis, fluido gástrico, semen, materia fecal, líquido de las vías respiratorias superiores, líquido peritoneal, líquido recogido de un sitio de inflamación, líquido recogido de un sitio de recogida agrupado, lavado bronquial, orina, material de biopsia, humor acuoso, material del rumen de un animal rumiante, muestra de células nucleadas, cualquier líquido asociado con una superficie mucosa, pelo y piel. En una realización preferida, el método se usa para diagnosticar sífilis.

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el polipéptido de tipo Tp17 deriva de un patógeno seleccionado del grupo que consiste en una bacteria, un virus, un parásito, un plásmido, un prion, un micoplasma y un agente micótico.

En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos previos, el patógeno es *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Yersinia pestis*, *Shigella flexnerii*, *Treponema denticola*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahemolyticus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Pasteurella multocida*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Porphyromonas gingivalis*, coronavirus de Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS), Virus Sincitial Respiratorio, virus de Hepatitis A, virus de Hepatitis B, virus de Hepatitis C, virus de Rubeola, *Toxoplasma gondii*, *Typanozoma* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter* spp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyji*, *Propionibacterium acnes*, *Listeria monocytogenes*, Virus del Herpes Simple de tipo 2, virus de la Gripe, virus TACARIBE, virus de Lengua Azul, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Coxiella burnetti*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhi*, citomegalovirus de Chimpancé, citomegalovirus Humano, virus del papiloma Humano, virus Dengue, Fiebre aftosa, virus del Nilo Occidental, virus de gripe Aviar, virus de la inmunodeficiencia Humana, LdMNPV, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Giardia lamblia*, *Plasmodium yoelii* y patógenos portados por *Anopheles gambiae*.

En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos previos, el patógeno es *Treponema denticola*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Coxiella burnetti*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, y *Salmonella typhi*, *Neisseria meningitidis* serogrupo A y serogrupo B, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Haemophilus ducreyji* y *Bordetella pertussis*. Preferentemente, el patógeno es *Treponema pallidum*.

En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos previos, el motivo contiene la secuencia de aminoácidos consenso CS2: Xaa1 Xaa2 Pro His Xaa3 Xaa4, (SEC ID N°: 3), en la que Xaa1 es Cys, Lys, Val, Ala o está ausente; Xaa2 es Ala, Cys, o Lys; Xaa3 es Ala, Asp, o Glu y Xaa4 es Cys, Gly o Lys. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos previos, el polipéptido de tipo Tp17 contiene la secuencia de Cys Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro His Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Cys (SEC ID N°: 2), en la que Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa5, Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa10, Xaa11, Xaa12, o Xaa13 es cualquier aminoácido o está ausente. En otras realizaciones más de cualquiera de los aspectos previos, el motivo contiene una secuencia de aminoácidos consenso CS3: Xaa Cys

Pro His Ala Gly (SEC ID N°: 25), en la que Xaa es Cys o Val. En otras realizaciones más de cualquiera de los aspectos previos, el motivo se selecciona del grupo que consiste en CCPHAG (SEC ID N°: 4), VCPHAG (SEC ID N°: 5), VAPHDC (SEC ID N°: 6), KAPHDK (SEC ID N°: 7), VKPHDG (SEC ID N°: 8); KKPHAK (SEC ID N°: 9), KAPHEK (SEC ID N°: 10), KKPHAC (SEC ID N°: 11), VAPHAG (SEC ID N°: 12), VKPHAK (SEC ID N°: 13), VKPHAC (SEC ID N°: 14), VAPHEG (SEC ID N°: 15), VKPHEK (SEC ID N°: 16), VCPHEK (SEC ID N°: 17), CKPHAG (SEC ID N°: 18), ACPHAG (SEC ID N°: 19) o KCPHDC (SEC ID N°: 20), VKPHDK (SEC ID N°: 21), KKPHAG (SEC ID N°: 22) y CAPHEK (SEC ID N°: 23).

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el polipéptido de lisozima contiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
Xaa Glu Ser Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser
Xaa Asp Tyr Gly Xaa Xaa Gln Ile Asn Xaa Xaa Xaa Trp Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa (SEC ID N°: 28),**

en la que Xaa es cualquier aminoácido o está ausente.

En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos previos, el polipéptido de tipo Tp17 o el polipéptido de lisozima, o un fragmento del mismo, se aísla de una muestra biológica, es un polipéptido recombinante, se fusiona con un marcador de afinidad, se fija a un soporte sólido (por ejemplo, una resina, un gel, una perla, un pocillo, una columna, una microplaca, una membrana, una matriz, una placa y un dispositivo de filtro), deriva de un polipéptido humano, se marca de forma detectable (por ejemplo, se marca con un fluoróforo, una proteína fluorescente, un cromóforo, un resto radiactivo, un resto lumínico, y un marcador enzimáticamente activo). En otras realizaciones más, el polipéptido de lisozima y el polipéptido de tipo Tp17 están presentes en una relación molecular de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1.000.000.

Las composiciones y métodos de la invención son útiles para identificar y/o cuantificar anticuerpos para patógenos tales como, por ejemplo, *Treponema pallidum*, *Escherichia coli* (por ejemplo, *E. coli* O157:H7 y *E. coli* K1), *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Yersinia pestis*, *Shigella flexnerii*, *Treponema denticola*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Helicobacter hepaticus*, *Salmonella typhimurium*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Pasteurella multocida*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter spp.*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyii*, *Propionibacterium acnes*, *Listeria monocytogenes*, Virus del Herpes Simple de tipo 2, virus de la Gripe, virus TACARIBE, virus de Lengua Azul, citomegalovirus de Chimpancé, citomegalovirus Humano, virus del papiloma Humano, virus Dengue, Fiebre aftosa, virus de la inmunodeficiencia Humana, LdMNPV, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Giardia lamblia*, *Plasmodium yoelii*, y patógenos portados por *Anopheles gambiae*. En otra realización, se detectan patógenos tales como *Mycobacterium paratuberculosis*, virus Ébola, virus de la Fiebre del Valle del Rift, virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS), virus de la Viruela, *Bacillus anthracis*, *Leishmania Spp.*, micoplasma, rickettsia, hongos y levaduras.

En otra realización, la invención proporciona composiciones para detectar anticuerpos antipatógeno en una muestra que comprende (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de TAPHRGLATLYNGDC (SEC ID N°: 26) o CSPEVGQMDC (SEC ID N°: 27) y (b) un polipéptido de lisozima de longitud completa o un fragmento del mismo.

En otra realización, están presentes lisozima (A) y polipéptidos de tipo Tp17 (B) en una relación molar (A/B) de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1.000.000. En una realización preferida, están presentes lisozima (A) y polipéptidos de tipo Tp17 (B) en una relación molar (A/B) de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1.000.000. En otra realización preferida, están presentes lisozima (A) y polipéptidos de tipo Tp17 (B) en una relación molar (A/B) de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1.000.000. Más preferentemente, están presentes lisozima (A) y polipéptidos de tipo Tp17 (B) en una relación molar (A/B) de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1.000, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1.000 o entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1.000.

Los métodos de la invención se usan para diagnosticar enfermedades tales como, por ejemplo, sífilis, infección por VIH, herpes genital, peste bubónica, disentería, shigelosis, caries dental, infección por *E. coli*, fibrosis quística,

99% idéntico a la lisozima humana (número de referencia de Genbank NP_000230, NP_783862, NP_115906, NP_898881, NP_653235, NP_065159, NP_776246, NP_995328, NP_002280).

5 Por "polipéptido de lisozima mutante" se entiende una secuencia de aminoácidos de lisozima que contiene al menos un cambio de aminoácido en relación con una secuencia de aminoácidos de lisozima de origen natural.

Por "molécula de ácido nucleico de lisozima" o "molécula de ácido nucleico de lisozima mutante" se entiende una molécula de ácido nucleico que codifica una lisozima o un polipéptido de lisozima mutante, respectivamente.

10 Breve descripción de los dibujos

El anterior y otros objetos, características y ventajas de la presente invención, así como la invención en sí misma, se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción de realizaciones preferidas cuando se leen junto con los dibujos adjuntos, en los que:

15 Las Figuras 1A y 1B ilustran los sitios de unión a lisozima en polipéptidos de tipo Tp17 de varias bacterias, virus, parásitos y organismos mamíferos y la secuencia consenso de 17 aminoácidos que definen. En la Figura 1B, los polipéptidos relacionados con Tp17 de *T. denticola*, *B. thetaiotaomicron*, *C. burnetti*, *H. influenzae*, *N. meningitidis* serogrupo A y serogrupo B, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *H. ducreyi*, *S. typhi*, *L. pneumophila*, *S. aureus*, *N. gonorrhoeae* y *B. pertussis* se ajustan a la siguiente secuencia consenso: Cys Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro His Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Cys (SEC ID N°: 176) en la que Xaa es cualquier aminoácido o está ausente. Las dos proteínas restantes de *P. gingivalis*, y *H. pylori* se agrupan bajo la siguiente secuencia consenso: Cys Xaa1 Xaa2 Xaa3 His Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Cys (SEC ID N°: 175), en la que x es cualquier aminoácido o está ausente. La Figura 1B es una tabla que define un motivo de unión a lisozima conservado entre una diversidad de patógenos bacterianos clínicamente relevantes.

La Figura 2 ilustra los sitios de unión a lisozima en polipéptidos de tipo Tp17 de varias bacterias, virus, parásitos, insectos y organismos mamíferos y la secuencia consenso de 6 aminoácidos que definen.

30 La Figura 3A es un alineamiento de secuencias de lisozima madura de varias especies. E₃₅ y D₅₃ en lisozima de pollo madura (o D₅₂ en lisozima humana madura) (▼) pertenecen a la díada catalítica y se conservan en todas las secuencias de lisozima conocidas. Se muestra una secuencia consenso en la parte inferior del alineamiento. La conservación de aminoácidos se representa de acuerdo con los símbolos de comparación de Risler (Risler *et al.* (1988) J. Mol. Biol. 204: 1019). En ese sistema de representación, X representa cualquier aminoácido o no aminoácido, las letras mayúsculas corresponden al 100% de conservación de aminoácidos, las letras minúsculas corresponden a un valor de conservación de aminoácidos comprendido entre 50% y 90%. Además, los cambios conservativos compartidos por más del 50% de las secuencias se representan usando los siguientes símbolos: \$ corresponde a leucina o metionina, ! corresponde a isoleucina o valina y # corresponde a asparagina o ácido aspártico.

La Figura 3B es una continuación del alineamiento de la secuencia de lisozima madura presentado en la Figura 3A. Se muestra una secuencia consenso en la parte inferior del alineamiento usando la nomenclatura descrita con respecto a la Figura 3A.

La Figura 4 ilustra una ventaja de la presente invención puesto que los kits de detección de anticuerpo de Tp17 convencionales no detectan anticuerpos para el complejo Tp17-lisozima. En una realización, la invención presenta un kit que contiene un polipéptido de tipo Tp17 y un polipéptido de lisozima. Tales kits son capaces de detectar anticuerpos para Tp17 solamente, lisozima solamente o un complejo Tp17-lisozima, si está presente.

La Figura 5 ilustra un ensayo de interacción de lisozima-proteína de transferencia de far western que comprende las siguientes cinco etapas: (1) inmovilización de lisozima purificada en un soporte sólido; (2) exploración de soporte sólido con un ligando para lisozima (por ejemplo, GST-Tp17); (3) unión de GST-Tp17 con anticuerpo de cabra anti-GST; (4) unión del anticuerpo de cabra con un conjugado de fosfatasa alcalina anti-cabra; y (5) tinción con sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina nitroazul de tetrazolio/bromocloro indolil fosfato de (NBT/BCIP).

La Figura 6 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 29) y nucleótidos (SEC ID N°: 30) de la proteína de fusión GST-Tp17. Las secuencias correspondientes al resto GST y a Tp17 se representan en cursiva y negrita, respectivamente. Las líneas numeradas, SEC ID N°: 30, representan la hebra de ADN con sentido; la hebra antisentido o de ARN está debajo de la hebra con sentido.

La Figura 7 ilustra la construcción de expresión de Tp17-HIS pET24a_Tpp17His. Este vector deriva del vector de expresión de pET24 (Novagen Inc., Madison, WI).

65

La Figura 8A es un gel teñido con azul brillante de Coomassie de fracciones cromatográficas de GST-Tp17 purificadas. Carril 1: proceso de purificación con lisozima de pollo añadida; carril 2: proceso de purificación sin lisozima de pollo añadida; carril 3: MPM: marcadores de peso molecular.

5 La Figura 8B es una transferencia de western y gel teñido con azul brillante de Coomassie de fracciones cromatográficas de Tp17-HIS purificado. Carril 1: transferencia de western usando un suero humano positivo para sífilis de proteínas recuperadas del proceso de purificación en presencia de lisozima de pollo añadida; carril 2: tinción con azul brillante de Coomassie de proteínas recuperadas del proceso de purificación en presencia de lisozima de pollo añadida. Se indican las secuencias peptídicas obtenidas por secuenciación de
10 aminoácidos N-terminales de las proteínas recuperadas de las bandas electroforéticas en los carriles 1 y 2.

La Figura 9A ilustra los resultados de explorar lisozima de pollo con GST-Tp47 en un ensayo de transferencia de far western. Carril MP: marcadores de peso molecular; carril 1: 1 μ g de lisozima de pollo purificada; carril 2: 5 μ g de lisozima de pollo purificada; carril 3: 10 μ g de lisozima de pollo purificada.
15

La Figura 9B ilustra los resultados de explorar lisozima de pollo con GST-Tp17 en un ensayo de transferencia de far western. Carril PM: marcadores de peso molecular; carril 4: 1 μ g de lisozima de pollo purificada; carril 5: 5 μ g de lisozima de pollo purificada; carril 6: 10 μ g de lisozima de pollo purificada.

La Figura 9C ilustra los resultados de explorar lisozima humana con GST-Tp47 en un ensayo de transferencia de far western. Carril PM: marcadores de peso molecular; carril 7: 1 μ g de lisozima humana purificada; carril 8: 5 μ g de lisozima humana purificada; carril 9: 10 μ g de lisozima humana purificada.
20

La Figura 9D ilustra los resultados de explorar lisozima humana con GST-Tp17 en un ensayo de transferencia de far western. Carril PM: marcadores de peso molecular; carril 10: 1 μ g de lisozima humana purificada; carril 11: 5 μ g de lisozima humana purificada; carril 12: 10 μ g de lisozima humana purificada.
25

La Figura 10 muestra una representación gráfica del efecto del polipéptido Tp17 en la actividad antibacteriana de lisozima. La concentración de GST-Tp17 en presencia de lisozima humana (O) y de pollo (\blacktriangle) se representó frente a la intensidad de fluorescencia relativa. Como control, se representó también la concentración de GST-Tp47 en presencia de lisozima humana (\blacklozenge) frente a la intensidad de fluorescencia relativa.
30

La Figura 11A muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína IVY de *E. coli* con la secuencia de aminoácidos de Tp17 de *T. pallidum*. Se muestra una secuencia consenso bajo el alineamiento. “#” identifica cambios conservativos (Asp/Glu) y semi-conservativos (Asp/Asn), mientras que “!” indica cambios Val/Ile.
35

La Figura 11B ilustra la estructura cristalina de tres posibles regiones de contacto de lisozima de pollo con proteína IVY de *E. coli*: los péptidos I, II y III se indican con sombreado oscuro.
40

La Figura 12 ilustra interacciones atómicas entre IVY de *E. coli* y lisozima de pollo, incluyendo la interacción entre el átomo de nitrógeno de H_{88-ivy} y el átomo de oxígeno de E_{53-chkclLys} y entre el átomo de oxígeno de D_{89-ivy} y el átomo de nitrógeno de R_{132-chkclLys}. La distancia entre los centros atómicos fue de 2,56 Å (1 angstrom = 10⁻¹⁰ metros) en la interacción H_{88-ivy} / E_{53-chkclLys} y 2,46 Å en la interacción D_{88-ivy} / R_{132-chkclLys}.
45

La Figura 13A ilustra la superficie molecular accesible al agua (clara) de lisozima de pollo solamente. La región accesible al agua expuesta en superficie del resto de aminoácido E₅₃ está sombreada.

La Figura 13B ilustra la superficie molecular accesible al agua de lisozima de pollo en complejo con IVY de *E. coli*. El resto de aminoácido E₅₃ está completamente enmascarado y es escasamente accesible al disolvente.
50

La Figura 13C ilustra la superficie molecular accesible al agua (clara) de lisozima de pollo. La región accesible al agua expuesta en superficie del resto de aminoácido R₁₃₂ está sombreada.

La Figura 13D ilustra la superficie molecular accesible al agua de lisozima de pollo en complejo con IVY de *E. coli*. El resto de aminoácido R₁₃₂ permanece parcialmente expuesto al disolvente.
55

La Figura 14A ilustra la unión de las dos cisteínas flanqueantes del sitio de unión de lisozima de pollo-IVY de *E. coli* que pone los restos de histidina y ácido glutámico en proximidad espacial estrecha, en una configuración capaz de entrar en contacto con los restos E₅₃ y R₁₃₂ de lisozima de pollo.
60

La Figura 14B ilustra la unión de las dos cisteínas flanqueantes del sitio de unión de lisozima-Tp17 de *T. pallidum* que probablemente ponen los restos de histidina y ácido aspártico en proximidades parcial estrecha, posiblemente en una configuración capaz de entrar en contacto con los restos E₅₃ y R₁₃₂ de lisozima.
65

La Figura 15 ilustra un alineamiento de la proteína gJ del virus del herpes simple de tipo 1 (VHS1) y virus del Herpes simple de tipo 2 (VHS2). Se aumenta una región de secuencia consenso bajo el alineamiento. El inserto demuestra que gJ de VHS1 no comparte la secuencia consenso de tipo Tp17 hallada en gJ de VHS2. “#” identifica cambios semi-conservativos tales como Asp/Asn.

5 La Figura 16A es una tabla que ilustra la intensidad de hemaglutinación relativa correspondiente a 4 sueros sífilíticos humanos límite (HPM10, HG38, HG48 y HG82). Las muestras de sueros se combinaron con Tp17 (R) en presencia o ausencia de lisozima de pollo (LisPollo) o lisozima humana (LisHumana). Los resultados se expresan como títulos de dilución recíprocos (por ejemplo, 80 significa positivo a la dilución 1/80).

10 La Figura 16B es una representación gráfica de los resultados de hemaglutinación de la Figura 16A. Reactivo Tp17 sin lisozima (barras negras); reactivo Tp17 complementado con lisozima de pollo (barras sombreadas); reactivo Tp17 complementado con lisozima humana (barras blancas). Los resultados se expresan como títulos de dilución recíproca (por ejemplo, 80 significa positivo a la dilución 1/80).

15 La Figura 17A es una tabla que ilustra la intensidad de hemaglutinación relativa correspondiente a 10 sueros sífilíticos humanos (Syph71, 09-4, 09-3, HSP91, HSP17, HSP3, 4932, 5895, HG62 y HG82). Las muestras de suero se combinaron con Tp17 (R) en presencia o ausencia de lisozima humana natural (LyzN) o lisozima humana recombinante (LyzR). Los resultados se expresan como títulos de dilución recíproca (por ejemplo, 80 significa positivo a la dilución 1/80).

20 La Figura 17B es una representación gráfica de los resultados de hemaglutinación de la Figura 17A. Reactivo Tp17 sin lisozima (barras negras); reactivo Tp17 complementado con lisozima humana natural (barras a cuadros); reactivo Tp17 complementado con lisozimas humanas recombinantes (barras blancas). Los resultados se expresan como títulos de dilución recíproca (por ejemplo, 80 significa positivo a la dilución 1/80).

25 La Figura 18A ilustra la mejora de la intensidad relativa de hemaglutinación con la adición de lisozima humana recombinante. Se ensayó un total de 34 sueros usando un reactivo Tp17 (R) o reactivo Tp17 complementado con lisozima humana recombinante (R+LyzR). Los resultados de la técnica se proporcionan como la inversa de la última dilución que proporcionó una aglutinación positiva. Cada resultado se convirtió a un número (dilución 1/80 es 1, dilución 1/160 es 2, etc.). El punto de corte es a la dilución 1/80 y un valor menor de 1 se considera un resultado negativo. FN y P significan respectivamente resultados de falso negativo y positivo, respectivamente.

30 La Figura 18B ilustra la intensidad relativa de hemaglutinación con la adición de lisozima humana recombinante en muestras de suero de falso negativo usando reactivo Tp17 (R) o reactivo Tp17 complementado con lisozima humana recombinante (R+LyzR). La intensidad de la aglutinación en las muestras de falso negativo se representa por un número entre 0 y 1 (1 representa el punto de corte de la técnica de hemaglutinación).

35 La Figura 19 ilustra un ensayo de hemaglutinación realizado con 34 sueros humanos. El ensayo se realizó usando un reactivo Tp17 (barras negras) o un reactivo Tp17 complementado con lisozima humana recombinante (barras blancas). El resultado de la técnica se proporciona por la inversa de la última dilución que dio una aglutinación positiva. El punto de corte es a la dilución 1/80. Los resultados se expresan como títulos de dilución recíproca (por ejemplo, 80 significa positiva a la dilución 1/80).

40 La Figura 20 ilustra el efecto de la lisozima en la especificidad del ensayo de hemaglutinación en 200 muestras de suero de banco de sangre negativas para sífilis usando reactivo Tp17 (R) o reactivo Tp17 complementado con lisozima humana recombinante (R+LyzR). La intensidad de la aglutinación en las muestras negativas se representa por un número entre 0 y 0,5. DT, desviación típica.

45 La Figura 21A ilustra la sensibilidad mejorada de un ensayo de sífilis de ELISA de segunda generación en presencia de lisozima humana recombinante.

50 La Figura 21B ilustra la sensibilidad mejorada de un ensayo de sífilis de ELISA de tercera generación en presencia de lisozima humana recombinante.

55 La Figura 22 muestra una separación cromatográfica por exclusión de tamaño de isoformas de Tp17-His. Tp-His purificado por afinidad se compone de tres poblaciones de moléculas: Tp17-His monomérico (pico 3), Tp17-His dimérico (pico 2) y Tp17-His multimérico (pico 1).

60 La Figura 23 muestra una separación cromatográfica por exclusión de tamaño de lisozima humana recombinante, purificada (Ventria Biosciences, Sacramento, CA, Estados Unidos). La lisozima humana recombinante está compuesta de una única población altamente homogénea de moléculas (pico 1).

65 La Figura 24 muestra una separación cromatográfica por exclusión de tamaño de complejos Tp17-His/huLYS.

Se representan los perfiles cromatográficos correspondientes al complejo de huLYS con Tp17-His monomérico (círculos) o Tp17-His dimérico (rombos). Los picos corresponden a complejos proteicos de Tp17/huLYS (picos 1 y 2) o excesos de monómero (huLys y Tp17) (picos 3 y 4).

5 La Figura 25 muestra una separación electroforética de SDS-PAGE de sobrenadante de cultivo bacteriano concentrado (5X) y la detección de proteínas bacterianas secretadas por tinción de plata. Se analizaron los siguientes patógenos: *Enterococcus faecalis* (carril 2), *Enterococcus faecium* (carril 3), *Staphylococcus aureus* (carril 4), *Streptococcus pneumoniae* (carril 5), *Streptococcus pyogenes* (carril 6), *Propionibacterium acnes* (carril 7), *Staphylococcus epidermidis* (carril 8), *Streptococcus agalactiae* (carril 9).

10 La Figura 26 es una gráfica de barras que muestra la actividad enzimática de lisozimas humanas medida en ausencia, o en presencia, de sobrenadante de cultivo de bacterias concentrado (5X) recogido de las siguientes ocho especies bacterianas: *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecium*. La altura de cada barra indica la actividad enzimática detectada. Hay un control de lisozima en el extremo izquierdo de la figura.

15 La Figura 27 es un diagrama esquemático que muestra el principio y diseño de un ensayo de exploración de alto rendimiento para la identificación de compuestos candidatos capaces de interferir con la formación de complejos de tipo Tp17 con lisozima. Etapa 1: poner en contacto una muestra de ensayo con huLYS marcado con peroxidasa de rábano rusticano (POD) y un polipéptido de tipo Tp17. Etapa 2: incubación de la muestra de ensayo a 37 °C. Etapa 3: lavado exhaustivo, adición de sustrato de POD y detección de señal.

20 Las Figuras 28A y 28B son gráficas de barras que muestran la inhibición de preparaciones terapéuticas, disponibles en el mercado, de lisozima de pollo por Tp17. La Figura 28A muestra la inhibición de la actividad bacteriolítica de Lizipaina® (Boehringer Ingelheim) tanto por GST-Tp17 como por Tp17-His a diversas relaciones molares. La Figura 28B muestra la inhibición de la actividad bacteriolítica de lisozima CHIESI (Laboratorio CHIESI) por GST-Tp17 a diversas relaciones molares. La altura de cada barra indica la actividad enzimática detectada. Hay un control de lisozima en el extremo izquierdo de la figura.

25 La Figura 29 es una gráfica de barras que muestra que la actividad bacteriolítica de r-Lysozyme™ (Novagen, VWR International, Mollet del Vallés, España) no era susceptible de inhibición por GST-Tp17 o Tp17-HIS, mientras que la actividad antibacteriana de lisozima humana estaba fuertemente inhibida. La altura de cada barra indica la fluorescencia detectada. Está presente un control de r-Lysozyme™ y un control de lisozima humana (HuLys) a la izquierda de cada conjunto experimental.

30 La Figura 30 muestra alineamientos de secuencias de las secuencias de inhibición/unión de lisozima de Ivy de *Escherichia coli*, Ivy de *Pseudomonas aeruginosa*, Ivy de *Yersinia pestis*, Tp17 de *Treponema pallidum* sp. pallidum y las tres isoformas (APP770, APP751 y APP695) de la proteína precursora amiloide beta humana (β -APP). Se indica el número de referencia de Genbank correspondiente a cada secuencia peptídica. La secuencia consenso deducida se representa usando la sintaxis de patrón usada en la base de datos PROSITE.

35 La Figura 31 muestra vistas en 3D de los dominios de unión/inhibición de lisozimas de Ivy de *Escherichia coli*, Ivy de *Pseudomonas aeruginosa* y β -APP humana.

40 La Figura 32 es un diagrama esquemático que muestra la organización de dominio de sAPP y proteína precursora beta amiloide de *Homo sapiens* (β -APP).

45 La Figura 33 muestra la detección de la unión de huLYS marcado con peroxidasa de rábano rusticano (POD) con sAPP inmovilizada, pero no con sAPP (304-612) inmovilizada. Se aplicaron puntualmente 10 μ g tanto de sAPP como de sAPP (304-612) en una membrana nitrocelulosa y se exploraron con POD-HuLYS diluido 1/1000.

50 Las Figuras 34A y 34B son tablas que muestran un alineamiento de proteínas inhibidoras/de unión a lisozima, sus números de referencia de Genbank, y la especie hospedadora en la que está presente el péptido. Estas secuencias de aminoácidos se identificaron por ordenador usando el patrón de péptido CX(1,5)[KRH][AG][KRH]X(0,2)[KR]X(0,1)[EDQN]C (mostrado en la Figura 31) para buscar en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL usando el algoritmo ScanProsite.

55 La Figura 35A es un diagrama esquemático que muestra un polipéptido Tp17 natural y polipéptidos Tp17 CPA y KPA mutantes. En Tp17 CPA la histidina en la posición de aminoácido 31 se reemplazó con alanina, y en Tp17 KPA la histidina en la posición de aminoácido 107 se reemplazó con alanina.

60 La Figura 35B es una tabla que muestra la capacidad inhibidora de los polipéptidos Tp17 CPA y KPA mutantes en relación con el polipéptido Tp17 natural.

65

La Figura 36 es una transferencia de western que muestra proteínas que tienen pesos moleculares de 45 kDA en cada uno de los carriles 1, 2 y 3 en los que el carril 1 es el Tp17 natural, el carril 2, mutante CPA y el carril 3, mutante KPA.

5 La Figura 37 muestra un alineamiento de secuencias peptídicas correspondientes a lisozima humana (huLYS) y lisozima de pollo (chkLYS), así como huLYS y proteína de tipo lisozima de espermatozoide humano (SLLP1). Este alineamiento muestra que SLLP1 está estrechamente relacionado tanto con huLYS como con chkLYS y apoya que Tp17 pueda unirse a SLLP1.

10 La Figura 38 es un diagrama esquemático que muestra que Tp17 puede unirse a SLLP1 en la superficie del espermatozoide y posteriormente interferir en el proceso de fertilización.

Descripción detallada de la invención

15 En general, la invención presenta composiciones y métodos relacionados con la detección de sujetos que tienen una infección patógena, tal como *Treponema pallidum*. Como se describe en más detalle posteriormente, la presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que un polipéptido expresado en patógeno, Tp17, se une a e inhibe lisozima, un polipéptido antimicrobiano expresado en el hospedador. Debido a que muchos patógenos expresan proteínas relacionadas con Tp17, este método de inhibir una respuesta inmune del hospedador probablemente esté conservado entre un gran número de patógenos. En consecuencia, la invención proporciona métodos de tratamiento o prevención de una infección patógena basándose en esta observación. Además, la invención proporciona ensayos de diagnóstico mejorados basados en la detección de anticuerpos que se unen a un complejo de Tp17-lisozima.

25 Polipéptidos de tipo P17 de *Treponema pallidum*

Las composiciones y métodos de la invención comprenden el polipéptido P17 de *Treponema pallidum* (Tp17) (número de referencia de Genbank - P29722; SEC ID N°: 31) y polipéptidos de tipo Tp17. Estos polipéptidos comparten ciertas similitudes estructurales, como se ilustra en las Figuras 1A, 1B y 2, denominadas colectivamente en el presente documento "polipéptidos de tipo Tp17" y/o similitudes funcionales, tales como la capacidad para unirse a lisozima o inhibir la actividad antimicrobiana o enzimática de lisozima. Al menos una y posiblemente dos regiones del polipéptido Tp17 (SEC ID N°: 31) se unen a lisozima: la secuencia polipeptídica VCPHAG (SEC ID N°: 5) en las posiciones de aminoácido 28-33 y la secuencia polipeptídica KAPHEK (SEC ID N°: 10) en las posiciones de aminoácidos 114-119. Las Figuras 1A y 2 proporcionan un alineamiento de polipéptidos de tipo Tp17 ejemplares de varias especies bacterianas, virales, parasitarias y mamíferas, junto con sus números de referencia. En particular, el alineamiento mostrado en la Figura 2 identifica una secuencia consenso conservada evolutivamente, Xaa_n Pro His Xaa_n, que es común para todos los polipéptidos de tipo TP 17.

En una realización, un polipéptido de tipo Tp17 comprende la secuencia de aminoácidos consenso de Xaa_n Pro His Xaa_n (SEC ID N°: 1), en la que Xaa es cualquier aminoácido, está ausente, o es un enlace peptídico, y n es al menos uno.

Haciendo referencia ahora a las Figuras 1A y 1B, en otra realización, el polipéptido de tipo Tp17 comprende la secuencia de aminoácidos consenso CS1: Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Pro His Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Cys (SEC ID N°: 2), en la que Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, Xaa₁₀, Xaa₁₁, Xaa₁₂ o Xaa₁₃ es cualquier aminoácido, ningún aminoácido o un enlace peptídico. En una realización preferida, Xaa₁ es Lys, Gly, Ile, Arg, Leu, Ala, Ser, Thr, Gln, Asn, Phe, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa₂ es Thr, His, Cys, Gln, Asn, Ile, Ser, Leu, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa₃ es His, Lys, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa₄ es Asn, Gly, Tyr, Leu, Ala, Cys, Glu, Thr, Arg, Met, Pro, Ile, Val, Phe, His, Gln, Lys, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa₅ es His, Arg, Asn, Leu, Ser, Lys, Glu, Gly, Pro, Ile, Thr, Cys, Trp, Val, Gln, Phe, Ala, Asp, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa₆ es Val, Cys, Ala, Asp, Ser, Pro, Gly, Glu, Lys, Leu, Gln, Ile, Tyr, Arg, Asn, Met, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa₇ es Asp, Glu, Ala, His, Val, Met, Pro, Lys, Arg, Cys, Asn, Gln, Phe, Leu, Ser, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa₈ es Gly, Asn, Ala, Ile, Arg, Glu, Lys, Thr, Tyr, Pro, Asp, Leu, Ser, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa₉ es Leu, Arg, Phe, Ile, Ala, Pro, Asn, Gln, Lys, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa₁₀ es Val, Thr, Asp, Glu, Tyr, Arg, Ala, Trp, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa_n es Pro, Asp, Lys, Asn, Gly, Thr, Ile, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa₁₂ es Ile, Val, Gly, Asp, Asn, Leu, ningún aminoácido o un enlace peptídico; y Xaa₁₃ es Asp, Glu, Cys, Thr, ningún aminoácido o un enlace peptídico. Además, un polipéptido de tipo Tp17 preferido que no se ajusta estrictamente a la CS 1 consenso es la proteína Int del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) con el motivo relacionado CSPEVGQMD (SEC ID N°: 27) y la proteína viral VP1 del virus de fiebre aftosa (FMDV) con el motivo relacionado TAPHRGLATLYNGDC (SEC ID N°: 26) (Figura 1A).

Haciendo referencia ahora a la Figura 2, en otra realización, el polipéptido de tipo Tp17 comprende la secuencia consenso de aminoácidos CS2: Xaa₁ Xaa₂ Pro His Xaa₃ Xaa₄ (SEC ID N°: 3), en la que Xaa₁ es Cys, Lys, Val, Ala, ningún aminoácido o un enlace peptídico; Xaa₂ es Ala, Cys o Lys; Xaa₃ es Ala, Asp o Glu y Xaa₄ es Cys, Gly o Lys.

**“XkXXrCelaXX\$kXXgXdgyXgXs\$X#WvClaXXESXXnTXatnXnXXgStD
YGifQINsXyWCndgktpXXXnXCX!XCsXLIXd#itXaCAKk!vXdXXgXXaWva
WkXhCXgXdlsXyXXgCXXX” (SEC ID N°: 32),**

5 en la que la conservación de aminoácidos está representada de acuerdo con los símbolos de comparaciones de Risler (Risler *et al.* (1988) J. Mol. Biol. 204: 1019). En este sistema de representación X representa cualquier aminoácido o está ausente, las letras en mayúscula corresponden al 100% de conservación de aminoácidos, las
10 letras en minúscula corresponden a un valor de conservación de aminoácidos comprendido entre el 50% y el 90%. Además, los cambios conservativos compartidos por más del 50% de las secuencias se representan usando los siguientes símbolos: \$ corresponde a leucina o metionina, ! corresponde a isoleucina o valina, y # corresponde a asparagina o ácido aspártico.

La expresión “lisozima” o “polipéptido de lisozima” abarca todos los homólogos, mutantes, longitud completa o fragmentos, sustituciones y modificaciones de los mismos, incluyendo deleciones y adiciones de los mismos. En una
15 realización, un polipéptido de lisozima incluye una mutación que reduce su capacidad para unirse a o de otro modo asociarse o interactuar con un polipéptido de tipo Tp17. Como resultado, el polipéptido de lisozima mutante es resistente a la inhibición por un polipéptido de tipo Tp17 expresado en patógeno. El Ejemplo 7 describe métodos ejemplares para identificación dirigida y aleatoria de mutantes de lisozima resistentes a inhibición. La lisozima exógena es una lisozima que se origina fuera de, por ejemplo, no es de origen natural, o aparece en una
20 concentración significativamente menor en la muestra o preparación de polipéptido de tipo Tp17 usada en los métodos de la invención. En una realización, la lisozima exógena es una lisozima que se añade a la muestra o al polipéptido de tipo Tp17 para componer las composiciones y métodos de la invención.

Polipéptido de tipo Tp17 y homólogos, mutantes y derivados de lisozima

25 La invención también proporciona variantes purificadas o recombinantes de un polipéptido de tipo Tp17 o un polipéptido de lisozima, incluyendo homólogos, mutantes y derivados. En algunos ejemplos, los polipéptidos mutantes recombinantes contienen mutaciones específicas (por ejemplo, mutaciones de sentido erróneo, inserciones, deleciones o mutaciones sin sentido) que inhiben la actividad biológica del polipéptido recombinante en
30 relación con un polipéptido de tipo Tp17 o polipéptido de lisozima. Polipéptidos mutantes de tipo Tp17 particularmente ventajosos se unen a lisozima con una afinidad que es igual o mayor que la afinidad de un polipéptido de origen natural, pero no inhiben la actividad antimicrobiana de la lisozima, tal como su capacidad para escindir un polisacárido expresado en patógeno. Dichos polipéptidos mutantes de tipo Tp17 son útiles en el
35 tratamiento o prevención de una infección por patógeno.

Polipéptidos de lisozima mutante de la invención particularmente ventajosos son incapaces de unirse, o muestran
40 unión reducida, con un polipéptido de tipo Tp17 en relación con una lisozima nativa (Figura 3). Preferentemente, la unión, por ejemplo, afinidad o cantidad de unión, se reduce en al menos un 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 95% o 100%. Otros polipéptidos de lisozima ventajosos conservan la capacidad para unirse a un polipéptido de tipo Tp17, pero dicha unión no inhibe la actividad antimicrobiana del polipéptido de lisozima, tal como su actividad enzimática.

Pueden inducirse efectos biológicos específicos mediante el uso de un homólogo, mutante o derivado de función limitada, por ejemplo, con menores efectos secundarios o mayor potencia terapéutica, en relación con el uso de una
45 referencia o una forma de origen natural (es decir, un tipo natural) de un polipéptido de tipo Tp17 o polipéptido de lisozima. Puede generarse un mutante de un polipéptido de tipo Tp17 o polipéptido de lisozima por mutagénesis, por ejemplo, introduciendo una mutación o mutaciones puntuales discretas, una inserción, una deleción u otras modificaciones y alteraciones. Por ejemplo, las mutaciones de origen natural o inducidas en laboratorio pueden generar polipéptidos de tipo Tp17 mutantes o polipéptidos de lisozima que conservan sustancialmente la misma, o
50 meramente un subconjunto, de la actividad biológica del polipéptido de tipo Tp17 o un polipéptido de lisozima del que derivó el polipéptido mutante. Como alternativa, pueden generarse formas antagonistas de un polipéptido de tipo Tp17 o un polipéptido de lisozima. Dichos antagonistas inhiben la función de un polipéptido de tipo Tp17 o polipéptido de lisozima de origen natural, uniéndose competitivamente con un ligando de origen natural.

Los homólogos purificados o recombinantes de polipéptidos de tipo Tp17 o polipéptidos de lisozima de la presente
55 invención también incluyen homólogos de origen natural de los polipéptidos de tipo Tp17 natural o polipéptidos de lisozima que son resistentes de forma natural a escisión proteolítica.

Los polipéptidos de tipo Tp17 o polipéptidos de lisozima también pueden modificarse químicamente para crear un
60 polipéptido de tipo Tp17 o derivados de polipéptidos de lisozima, respectivamente, formando conjugados covalentes o agregados con otros restos químicos, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo, y similares. Pueden prepararse derivados covalentes de polipéptidos de tipo Tp17 o polipéptidos de lisozima uniendo los restos químicos con grupos funcionales en cadenas laterales de aminoácidos de la proteína o en el extremo N terminal o en el extremo C terminal de la proteína.

65 La modificación de la estructura de los polipéptidos de tipo Tp17 o polipéptidos de lisozima (por ejemplo, mutaciones

de aminoácidos) pueden ser para tales fines como potenciar la eficacia terapéutica o profiláctica, estabilidad (por ejemplo, periodo de caducidad *ex vivo* y resistencia a degradación proteolítica), o modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, alterar el patrón de fosforilación de la proteína). Dichos polipéptidos modificados o mutantes de tipo Tp17 o polipéptidos de lisozima, cuando se diseñan para conservar al menos una actividad de la forma de origen natural de los polipéptidos de tipo Tp17 o polipéptidos de lisozima, o para producir antagonistas específicos de los mismos, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos de tipo Tp17 o polipéptidos de lisozima descritos en más detalle en el presente documento. Tales polipéptidos de tipo Tp17 modificados o polipéptidos de lisozima pueden producirse, por ejemplo, por sustitución, delección o adición de aminoácidos. La variante de sustitución puede ser un aminoácido conservado sustituido o un aminoácido no conservado sustituido.

Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (es decir, mutaciones isostéricas y/o isoeléctricas) no tenga un efecto importante en la actividad biológica de la molécula resultante. Son reemplazos conservativos los que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente pueden dividirse en cuatro familias: (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) básicos = lisina, arginina, histidina; (3) no polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. De forma similar, el repertorio de aminoácidos puede agruparse como (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) básicos = lisina, arginina, histidina; (3) alifáticos = glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, con serina y treonina opcionalmente agrupadas por separado como alifáticos-hidroxilos; (4) aromáticos = fenilalanina, tirosina, triptófano; (5) amidas = asparagina, glutamina; y (6) que contienen azufre = cisteína y metionina. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un péptido da como resultado un polipéptido de tipo Tp17 funcional u homólogo de polipéptido de lisozima (por ejemplo, funcional en el sentido de que el polipéptido resultante imita o antagoniza la forma natural) puede determinarse fácilmente evaluando la capacidad del péptido variante para producir una respuesta en un ensayo o en células de una manera similar a la proteína natural, o inhibir de forma competitiva dicha respuesta. Los polipéptidos en los que haya tenido lugar más de un reemplazo pueden ensayarse fácilmente de la misma manera. Se ejemplifican ensayos y reactivos útiles para ensayar tales homólogos a lo largo de la memoria descriptiva.

El término "polipéptido" incluye por lo tanto péptidos o proteínas de origen natural, así como péptidos o proteínas producidos de forma recombinante o sintética. El polipéptido puede abarcar cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, en las que los restos de aminoácidos se unen por enlaces peptídicos covalentes. Sin embargo, también están abarcados por la invención peptidomiméticos de tales polipéptidos en los que los aminoácidos y/o enlaces peptídicos se han reemplazado por análogos funcionales. De acuerdo con la invención, un aminoácido abarca un análogo de aminoácido de origen no natural.

La invención contempla además un método para generar conjuntos de mutantes combinatorios de polipéptidos de tipo Tp17 o polipéptidos de lisozima así como mutantes de truncamiento, y es especialmente útil para identificar secuencias variantes potenciales (por ejemplo, homólogos). El fin de explorar dichas bibliotecas combinatorias es generar, por ejemplo, nuevos polipéptidos de tipo Tp17 mutantes o polipéptidos de lisozima mutantes que pueden actuar como agonistas o antagonistas, o, como alternativa, poseen actividades completamente nuevas. Por lo tanto, pueden generarse polipéptidos mutantes derivados de forma combinatoria que tienen una potencia aumentada en relación con una forma de origen natural (tipo natural) del polipéptido.

En otra realización, la invención presenta polipéptidos de tipo Tp17 aislados o polipéptidos de lisozima, preferentemente preparaciones sustancialmente puras, por ejemplo, de polipéptidos derivados de fluidos corporales o producidos de forma recombinante. Los polipéptidos de tipo Tp17 o polipéptidos de lisozima pueden comprender polipéptidos de longitud completa o pueden comprender fragmentos más pequeños correspondientes a uno o más motivos/dominios particulares, o fragmentos que comprenden al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 125, aproximadamente 148 aminoácidos de longitud, por ejemplo.

Pueden producirse péptidos por síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (por ejemplo, Stewart *et al.* (1969) *Solid Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co. San Francisco; Merrifield (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154). Puede realizarse síntesis proteica *in vitro* por transcripción y traducción acoplada *in vitro*, por ejemplo usando un kit TnT® (Promega, Madison, WI) o RTS (Roche Applied Science, Barcelona, España) o usando un enfoque automático, por ejemplo usando un Sintetizador Peptídico Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Pueden realizarse péptidos por uno o más métodos y unirse químicamente para producir una molécula de longitud completa.

La caracterización del sitio de unión a lisozima en Tp17 y la secuencia consenso de ese sitio de unión que se comparte por varios polipéptidos de tipo Tp17 derivados de patógeno pueden aprovecharse para proporcionar inhibidores de la unión de polipéptido de tipo Tp17/lisozima y métodos para prepararlos y usarlos como diagnóstico (por ejemplo, sondas), profilaxis o tratamientos para varias enfermedades patógenas o enfermedades caracterizadas por actividad de lisozima alterada. Además, la invención proporciona variantes naturales y modificadas

genéticamente de lisozimas, incluyendo homólogos, mutantes y derivados y métodos para prepararlos, que son incapaces de unirse a polipéptidos de tipo Tp17, que conservan otras funciones de lisozima, tales como unión a peptidoglicano e hidrólisis, por ejemplo, escapando de este modo a la inhibición por los polipéptidos de tipo Tp17. Estas lisozimas no naturales, incluyendo homólogos, mutantes y derivados, pueden usarse para tratar o prevenir muchas enfermedades patógenas, incluyendo sífilis, SIDA y herpes genital.

La invención también proporciona polipéptidos mutantes de tipo Tp17 que tienen secuencias de unión a lisozima alteradas, y polipéptidos de lisozima mutantes que tienen secuencias de unión a polipéptido de tipo Tp17 alteradas. Preferentemente, estos polipéptidos mutantes muestran afinidades de unión alteradas. Particularmente se prefieren polipéptidos mutantes de tipo Tp17 que tengan un aumento (por ejemplo, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o 100%) de su unión con lisozima en relación con un polipéptido de tipo Tp17 nativo. Dichos polipéptidos mutantes compiten con un polipéptido de tipo Tp17 nativo por la unión con la lisozima. Se prefieren más polipéptidos mutantes de tipo Tp17 que se unen a lisozima con al menos afinidad nativa, pero que no inhiban una actividad antimicrobiana de lisozima, tal como una actividad enzimática. Los polipéptidos mutantes de lisozima particularmente preferidos tienen sitios de unión alterados que reducen (por ejemplo, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o 100%) o eliminan la unión con un polipéptido relacionado con Tp17. Otros polipéptidos mutantes de lisozima preferidos se unen a un polipéptido relacionado con Tp17, pero dicha unión no reduce ni elimina la actividad antimicrobiana de la lisozima.

Otras alteraciones en un polipéptido relacionado con Tp17 o en un polipéptido de lisozima alteran la función *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, como se efectúa por mutagénesis dirigida o bioquímica combinatoria. Por ejemplo, se proporcionan variantes de lisozima que han perdido la capacidad para unirse a peptidoglicano pero conservan la capacidad para unirse a polipéptido de tipo Tp17.

La invención proporciona además polipéptidos de tipo Tp17 que pueden usarse para realizar polipéptidos de fusión con un polipéptido de interés, que pueden purificarse por afinidad de forma económica usando lisozima (por ejemplo, que está unida al soporte sólido, tal como una resina, perla, pocillo, microplaca, columna, gel, membrana o dispositivo de filtro).

La información de secuencia proporcionada por la presente invención también proporciona sondas específicas para la identificación de polipéptidos de tipo Tp17 usando una lisozima como sonda, o identificación de lisozima usando un polipéptido de tipo Tp17 como sonda. Además, los anticuerpos pueden inducirse para secuencias que definan estos sitios de unión usando métodos convencionales.

Métodos para mejorar los métodos de detección de infección por patógeno

La presente invención también proporciona métodos y composiciones para mejorar la detección de anticuerpos anti-patógenos en una muestra, por ejemplo, como diagnóstico de la infección por patógeno. Aunque los ejemplos de tales métodos de diagnóstico pueden referirse específicamente a sífilis, un experto en la materia entenderá que tales métodos son útiles en general para detectar una respuesta inmune contra prácticamente cualquier patógeno que produzca un polipéptido de tipo Tp17. Los métodos de diagnóstico de la invención implican la detección de un anticuerpo anti-patógeno en una muestra usando reactivos que incluyen, entre otras cosas, lisozima. El Ejemplo 8 proporciona una descripción de un ensayo de sífilis ejemplar para anticuerpos anti-polipéptido de tipo Tp17. El método anterior y otros se analizan en más detalle posteriormente.

Sin quedar ligado a ninguna teoría particular, es probable que un sujeto sífilítico genere una respuesta inmune no solamente contra una proteína Tp17 aislada, sino también contra el complejo de lisozima/polipéptido Tp17. Poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con lisozima, posibilita la detección de anticuerpos que reconocen el complejo Tp17/lisozima y aumenta la sensibilidad del ensayo de diagnóstico de sífilis. De forma similar, cualquier método de diagnóstico de patógenos que implique la detección de un anticuerpo que reconozca un complejo de lisozima/proteína de tipo Tp17 se potencia por la inclusión de lisozima en los reactivos de ensayo. Preferentemente, la adición de lisozima a un reactivo de ensayo aumenta la sensibilidad del método de diagnóstico en al menos 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o incluso tanto como 85% o 95% en relación con métodos de diagnóstico convencionales.

Composiciones y métodos para detectar anticuerpos anti-patógenos

La invención proporciona composiciones y métodos para detectar anticuerpos anti-patógenos en una muestra que son indicativos de la presencia de, infección por o respuesta inmune (por ejemplo, respuesta inmune humoral) a un patógeno bacteriano, tal como, por ejemplo, *Treponema pallidum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Yersinia pestis*, *Shigella flexnerii*, *Treponema denticola*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Helicobacter hepaticus*, *Salmonella typhimurium*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Pasteurella multocida*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter spp.*, y *Agrobacterium tumefaciens*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus*

5 *influenzae*, *Haemophilus ducreyji*, *Propionibacterium acnes*, *Listeria monocytogenes*. Además, la composición se usa para detectar la presencia de, infección por, o respuesta inmune (por ejemplo, respuesta inmune humoral) a un patógeno viral, tal como, por ejemplo, virus Coxsackie, Virus del Herpes Simple de tipo 2, virus de Gripe A, virus TACARIBE, virus de lengua azul, citomegalovirus de chimpancé, hepatitis B, virus de hepatitis C, citomegalovirus humano (HCMV), virus del papiloma humano, virus Dengue, virus de encefalitis equina oriental, fiebre aftosa (HMD), virus de inmunodeficiencia humana, virus de la rubeola y LdMNPV. Además, la composición se usa para detectar la presencia de, infección por, o respuesta inmune (por ejemplo, respuesta inmune humoral) a un parásito, tal como, por ejemplo, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Giardia lamblia*, *Plasmodium yoelii* y patógenos portados por *Anopheles gambiae*. Además, la composición se usa para detectar la presencia de, infección por, o respuesta inmune (por ejemplo, respuesta inmune humoral) a *Mycobacterium paratuberculosis*, virus Ébola, virus de fiebre del valle del Rift, virus de Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS), virus de viruela, *Bacillus anthracis*, *Leishmania* Spp., micoplasma, rickettsia, hongos o levadura. Tales anticuerpos se identifican, por ejemplo, por un ensayo que detecta la unión del anticuerpo con un polipéptido de tipo Tp17, un polipéptido de lisozima, o un complejo de polipéptido de tipo Tp17/polipéptido de lisozima, o un fragmento del mismo.

10 El polipéptido de tipo Tp17 o polipéptido de lisozima puede comprender un marcador de afinidad, tal como, por ejemplo, glutatión S-transferasa (GST), cola de 6-histidinas (HIS), proteína de unión a maltosa, péptido de tipo elastina o un marcador de Strep (IBA, Goettingen, Alemania). El polipéptido de tipo Tp17, lisozima y/o complejo de polipéptido-lisozima de tipo Tp17 puede estar unido a un soporte sólido tal como una resina, perla, pocillo, microplaca, columna, gel, membrana, matriz, placa o dispositivo de filtro. El uso de una placa multipocillo o una microplaca es útil para el ensayo a gran escala de numerosas muestras o para ensayar una muestra única por duplicado o con respecto a la presencia de varios agentes patógenos.

20 En una realización, el método de la invención comprende detectar unión, si está presente, de anticuerpos anti-patógenos presentes en la muestra con (i) el polipéptido de tipo Tp17 solamente; (ii) la lisozima solamente; o (iii) el complejo de lisozima-polipéptido de tipo Tp17. En una realización, el método comprende las etapas de (a) poner en contacto una muestra con un polipéptido de tipo Tp17 en condiciones que permitan la unión de un anticuerpo en la muestra con el polipéptido de tipo Tp17; y (b) poner en contacto la muestra con una lisozima exógena sustancialmente pura en condiciones que permitan la unión de un anticuerpo con la lisozima. El polipéptido de tipo Tp17 y la lisozima pueden estar unidos entre sí o asociarse de otro modo de modo que un anticuerpo pueda unirse tanto al polipéptido de tipo Tp17 como a las lisozimas, por ejemplo, un complejo del polipéptido de tipo Tp17 y la lisozima. La unión del anticuerpo con el polipéptido de tipo Tp17, lisozima o su complejo puede producirse a 15-25 °C, o cualquier temperatura que permita la unión del anticuerpo con el polipéptido de tipo Tp17 y/o lisozima.

30 En una realización preferida, el ensayo es un ensayo de aglutinación, tal como, por ejemplo, un ensayo de hemaglutinación realizado como se describe en los Ejemplos 8 y 9. Las partículas vehículo usadas en el ensayo de aglutinación pueden ser, por ejemplo, glóbulos rojos, partículas de agregados proteicos, partículas poliméricas, partículas inorgánicas, partículas paramagnéticas o células de levadura. En una realización preferida, la hemaglutinación se potencia en al menos aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 veces, de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 10 veces, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces, por ejemplo, preferentemente al menos aproximadamente 3 veces, mediante la adición de lisozima. La lisozima puede ser de la misma especie que el sujeto del que se toma la muestra de ensayo (por ejemplo, ser humano). La lisozima se añade al reactivo polipeptídico de tipo Tp17, el tampón de dilución, o cualquiera de los reactivos o frascos usados en el ensayo y pueden añadirse en cualquier momento, una vez o en etapas, por ejemplo, antes, durante o después de que la muestra haya entrado en contacto con el resto de los reactivos o frascos del ensayo. En una realización particular, está presente lisozima exógena en un intervalo de concentración de aproximadamente 1 femtogramo/ml a aproximadamente 999 miligramos/ml. La lisozima está presente en un intervalo de concentración de aproximadamente 1 nanogramo/ml a aproximadamente 999 microgramos/ml (por ejemplo, 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 o 1000 nanogramos o microgramos/ml).

40 En otra realización, se detectan anticuerpos anti-patógeno usando un ensayo de ELISA. Se conocen bien en la técnica métodos para llevar a cabo ensayos de ELISA. Brevemente, para detectar la presencia de anticuerpos para polipéptidos de tipo Tp17 en una muestra, por ejemplo, una fase sólida, tal como una placa de ELISA, se recubre con un polipéptido de tipo Tp17 solamente, una combinación de polipéptido de tipo Tp17 y lisozima, o lisozima solamente, en pocillos separados en una placa. Después de lavar, se añade una muestra que puede contener un anticuerpo anti-polipéptido de tipo Tp17, un anticuerpo anti complejo de lisozima-polipéptido de tipo Tp17 y/o anticuerpo anti-lisozima a los pocillos. La muestra puede aplicarse a varios pocillos de la placa de ELISA, y detectarse mediante marcaje directo (si es apropiado), usando un compañero de unión secundario para el anticuerpo anti-polipéptido de tipo Tp17 tal como una IgG de conejo anti-humano que tenga un marcador detectable, o usando un anticuerpo terciario o reactivo de detección (por ejemplo, estreptavidina-biotina o proteína A o proteína G marcada). Como alternativa, también puede conseguirse detección usando polipéptido de tipo Tp17 marcado. Si los anticuerpos específicos se marcan de forma diferencial, puede producirse detección de más de un anticuerpo en la misma muestra, por ejemplo, en el mismo pocillo de la placa de ELISA. Esto puede conseguirse a través del uso de marcadores que producen señales distintas que pueden cuantificarse de forma independiente, por ejemplo,

usando colorantes con diferentes máximos de absorción de UV. Los valores de ELISA para los pocillos tratados de forma diversa pueden compararse para determinar la presencia de anticuerpos para polipéptido de tipo Tp17 solamente, complejo de lisozima-polipéptido de tipo Tp17 y/o lisozima solamente. Cualquiera de los inmunoensayos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica de detectar anticuerpos para polipéptido de tipo Tp17 y el complejo de lisozima-polipéptido de tipo Tp17 mediante el uso de lisozima que crea, en la fase líquida o sólida, complejos de polipéptido de tipo Tp17-lisozima que pueden unirse con sus anticuerpos afines, de acuerdo con métodos convencionales.

Sin quedar limitado a una teoría particular, el ensayo probablemente se potencia mediante la adición de lisozima debido a que la lisozima forma complejos con los polipéptidos de tipo Tp17, formando de ese modo sustrato para unión con anticuerpos que se unen solamente al complejo de lisozima-Tp17 y no a polipéptido de tipo Tp17 solamente. Por lo tanto, añadiendo lisozima al ensayo, los anticuerpos dirigidos al polipéptido de tipo Tp17 solamente, la lisozima solamente o el complejo se detectan en la muestra (Figura 4).

En una realización de la invención, el ensayo puede conseguirse usando una lisozima recombinante o purificada natural que no tenga una actividad de unión a peptidoglicano (por ejemplo, un mutante de lisozima), de modo que se enriquezca la unión de la lisozima con el polipéptido de tipo Tp17. Esta unión selectiva puede conseguirse, por ejemplo, por mutagénesis dirigida de lisozima, u otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 7.

En otra realización, la molécula de lisozima puede alterarse para eliminar su capacidad para unirse a un polipéptido de tipo Tp17, de modo que el mutante resultante es resistente a la inhibición por un polipéptido de tipo Tp17. Tales mutantes pueden presentar una actividad antimicrobiana potenciada contra patógenos equipados con factores de virulencia de polipéptido de tipo Tp17. Las mutaciones localizadas en la secuencia codificante de lisozima, seleccionadas de modo que no se vean afectadas las actividades antimicrobiana y/o acetil muramidasa, desestabilizan la interacción lisozimas/inhibidor y confieren resistencia a inhibición por proteínas patógenas tales como el antígeno Tp17 de *T. pallidum* o miembros de la familia Ivy. Tales lisozimas mutantes representan nuevas e interesantes composiciones para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Además, dada su potencia y espectro de actividad mejorados, son superiores a la lisozima de pollo usada en la actualidad en preparaciones médicas disponibles en el mercado.

Métodos para detectar patógenos y ligandos de polipéptido de tipo Tp17

Las composiciones y métodos de la invención también pueden usarse para detectar un patógeno en una muestra. Pueden usarse composiciones que comprenden un ligando capaz de unirse a un polipéptido de tipo Tp17, tal como polipéptido de lisozima o una molécula que pueda competir con la unión con lisozima. Como alternativa, el ligando puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, o un fragmento Fab que se una al polipéptido de tipo Tp17.

Los ligandos pueden detectarse directamente, por ejemplo, unidos a una molécula de detección, tal como un fluoróforo, una proteína fluorescente, un cromóforo, resto radiactivo, resto luminífero o indicador o marcador enzimáticamente activo. Se conocen bien en la técnica moléculas de detección ejemplares, por ejemplo, conjugados de fluoresceína, conjugados de peroxidasa de rábano rusticano, conjugados de fosfatasa alcalina y conjugados de isoluminol. En esta realización de la invención, se pone en contacto una muestra con lisozima o con otro ligando de tipo Tp17 en condiciones que permitan la unión del ligando con un patógeno o un polipéptido patógeno y se detecta la unión de la lisozima con el patógeno o polipéptido patógeno, si está presente. Dicha unión es indicativa de la presencia del patógeno o polipéptido patógeno en la muestra.

Las composiciones y métodos de la invención también son útiles para detectar la presencia de lisozima en una muestra. Una muestra se pone en contacto con un polipéptido de tipo Tp17 y se detecta la unión del polipéptido de tipo Tp17 con la lisozima en la muestra.

Kits

Las composiciones y métodos de la invención pueden realizarse en kits de diagnóstico o terapéuticos que contienen al menos uno de un polipéptido de tipo Tp17, lisozima y un ligando de los mismos. También pueden incluirse en el kit reactivos necesarios o útiles para la administración, ensayo o purificación del polipéptido de tipo Tp17 o polipéptido de lisozima, tales como frascos de reacción (por ejemplo, que comprenden un soporte sólido, resina, perla, pocillo, microplaca, columna, gel, membrana y dispositivo de filtro), patrones de control o manuales de instrucciones. Tales kits de diagnóstico o terapéuticos son útiles para el diagnóstico o tratamiento de una infección patógena, tal como sífilis o herpes, o para enfermedad de Alzheimer.

Péptidos de fusión y cromatografía de afinidad

Los polipéptidos de tipo Tp17, o fragmentos de los mismos, de la invención son útiles como marcadores de afinidad para su uso en cromatografía de afinidad usando polipéptidos de lisozima, por ejemplo, que están unidos a un

soporte sólido, tal como una columna. La invención proporciona por lo tanto proteínas de fusión recombinantes (por ejemplo, proteínas de fusión Tp17) que comprenden una primera secuencia polipeptídica unida por un enlace peptídico a una segunda secuencia polipeptídica, en la que la primera secuencia polipeptídica comprende un polipéptido de tipo Tp17 y la segunda secuencia polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos de interés.

5 En una realización, la primera secuencia polipeptídica de interés no está unida de forma natural a la segunda secuencia polipeptídica. El polipéptido de tipo Tp17 actúa como un casete de purificación que se usa para unir el polipéptido de interés con la columna de afinidad de lisozima. El casete de purificación puede situarse en cualquier lugar en la molécula, por ejemplo, en el extremo N terminal o el extremo C terminal del polipéptido de interés. Como alternativa, el casete de purificación puede situarse entre el extremo N terminal y el C terminal. El polipéptido de fusión recombinante se prepara uniendo una primera secuencia polipeptídica por un enlace peptídico con una

10 segunda secuencia polipeptídica, comprendiendo la primera secuencia polipeptídica un casete de purificación de polipéptido de tipo Tp17 y comprendiendo la segunda secuencia polipeptídica una secuencia de aminoácidos de interés. La proteína de fusión de Tp17 se usa después en métodos para purificar el polipéptido de interés poniendo en contacto una muestra que comprende la proteína de fusión de Tp17 con lisozima en condiciones que permiten que el polipéptido de tipo Tp17 se una a lisozima. Después el complejo formado se lava y la proteína de fusión de Tp17 se eluye de la lisozima y la proteína de interés puede aislarse del casete de purificación de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En una realización, el fragmento de polipéptido de tipo Tp17 es un fragmento de 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 o 100 aminoácidos que comprende al menos una secuencia consenso de unión a lisozima (por ejemplo, SEC ID N°: 1).

20 Preparación de anticuerpos

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales adecuados para su uso en los inmunoensayos de la invención por métodos de hibridoma convencionales, usando ensayos de unión diferenciales para asegurar que los anticuerpos sean específicos para un polipéptido de tipo Tp17, lisozima, un complejo de polipéptido de tipo Tp17-lisozima u otro antígeno de interés y no muestren reactividad cruzada, o muestren reactividad cruzada limitada entre las proteínas relacionadas. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos monoclonales adecuados usando métodos de ingeniería de anticuerpos tales como presentación de fagos. Se conocen en la técnica métodos para obtener anticuerpos altamente específicos de bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpos, y están disponibles varias bibliotecas de anticuerpos de fagos de, por ejemplo, MorphoSys (Martinsried, Alemania), Cambridge Antibody Technology (Cambridge, Reino Unido) y Dyax (Cambridge, MA). Se describen métodos de presentación de fagos adecuados, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 6.300.064 y 5.969.108, que se incorporan por la presente por referencia en su totalidad. Véase también, por ejemplo "Antibody Engineering", McCafferty *et al.* (Eds.) (IRL Press 1996) y referencias en la misma. Los métodos de anticuerpo de presentación de fagos pueden usar bibliotecas de anticuerpos en el formato Fab o scFv. Una vez que los genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo se recuperan de los anticuerpos de fago, pueden prepararse anticuerpos en cualquier formato adecuado (por ejemplo, anticuerpos completos, Fab, scFv, etc.).

Pueden usarse también otras preparaciones de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos de camélidos, que contienen solamente cadenas de inmunoglobulina pesadas. Véase, por ejemplo, Muyldermans *et al.* (2001) J. Biotechnol. 74:277-302 y referencias en el mismo.

Como alternativa, pueden usarse preparaciones de anticuerpos policlonales para la detección de antígenos tales como polipéptidos de tipo Tp17, lisozima u otro antígeno de interés. También pueden usarse métodos de presentación de fagos para preparar poblaciones reproducibles o anticuerpos policlonales. Por ejemplo, una biblioteca de anticuerpos puede vaciarse exhaustivamente de clones que reaccionan de forma cruzada por absorción en otros antígenos unidos a una superficie sólida, y después se usa para selección sobre una superficie sólida para identificar anticuerpos que se unan al antígeno de interés. La población de clones resultante también puede vaciarse de clones reactivos de forma cruzada por absorción sobre superficies que porten proteínas irrelevantes, tales como albúmina de suero bovino, etc, usando métodos bien conocidos en la técnica. Esto da como resultado identificación de una población de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno de interés.

También pueden prepararse anticuerpos policlonales específicos para un antígeno de interés usando métodos tradicionales basados en animales. Estos antígenos, tales como, por ejemplo, péptidos, pueden conjugarse en su extremo N o C terminal con proteínas vehículo tales como albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH) y usarse para inmunizar animales, tales como conejos, usando regímenes de inmunización bien conocidos. Pueden obtenerse anticuerpos policlonales específicos del suero del animal mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad sobre una matriz que contenga el péptido usado para la inmunización unido a un soporte sólido. De nuevo, por ejemplo, pueden absorberse antisueros inducidos contra polipéptidos de tipo Tp17 contra otros polipéptidos unidos a un soporte sólido para retirar cualquier anticuerpo reactivo de forma cruzada, y viceversa.

60 Inmunoensayos

Puede usarse cualquiera de una variedad de inmunoensayos en la práctica de los métodos de la invención. Por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), ensayos de aglutinación, radioinmunoensayos,

ensayos turbidimétricos, ensayo nefelométrico, inmunocromatografía, ensayos de quimioluminiscencia y ensayo fluorescente. Tales ensayos se conocen bien en la técnica, y se describen en detalle en el presente documento (Andreotti *et al.* (2003) *Biotechniques* 35:850-859).

5 Se conocen bien en la técnica métodos para llevar a cabo ensayos de ELISA. Brevemente, para detectar la presencia de polipéptido de tipo Tp17 en una muestra, por ejemplo, una fase sólida, tal como una placa de ELISA, se recubre con lisozima. Después de lavar, se añade una muestra que puede contener un polipéptido de tipo Tp17. La muestra puede aplicarse a varios pocillos de la placa de ELISA, y detectarse mediante marcaje directo (si es apropiado), usando un anticuerpo para un polipéptido de tipo Tp17 que está marcado, o usando un anticuerpo secundario y anticuerpo terciario o reactivos de detección (estreptavidina-biotina) o proteína A o proteína G marcada. Si los anticuerpos específicos están marcados de forma diferencial, puede producirse detección de más de un antígeno en la misma muestra, por ejemplo, en el mismo pocillo de la placa de ELISA. Esto requiere uso de marcadores que produzcan señales distintas que pueden cuantificarse de forma independiente, por ejemplo, usando colorantes con máximos de absorción de UV diferentes. Los colorantes y espectros útiles incluyen, pero sin limitación, ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbentiazolin-b-sulfónico), sustrato cromogénico para peroxidasa de rábano rusticano (que absorbe luz a 410 nm) y TMB (3,3',5,5'-tetrametil bencidina) sustrato cromogénico para peroxidasa de rábano rusticano (absorbe luz a 450 nm después de la adición de H₂SO₄ 1 M).

20 Pueden usarse otros métodos de detección de proteínas adecuados en lugar de, o además de los inmunoensayos anteriores. Por ejemplo, cuando se usan anticuerpos contra epítomos no superficiales de proteínas, puede usarse digestión enzimática o química (por ejemplo, CNBr) de las proteínas antes de detección. Por ejemplo, podría obtenerse un polipéptido de tipo Tp17 de longitud completa usando un anticuerpo genérico que se une a un polipéptido de tipo Tp17, seguido de digestión con proteínas enzimáticas y detección con anticuerpos específicos para polipéptido de tipo Tp17. Se describen métodos mejorados para digestión por CNBr de proteínas en Kaiser *et al.* (1999) *Anal. Biochem.* 266:1-8.

30 Otros métodos que pueden usarse incluyen transferencia de Western, transferencia de Far Western, inmunohistoquímica, técnicas de transferencia puntual/por ranuras, microplacas proteicas y biosensores. Para transferencia de western, por ejemplo, pueden someterse a electroforesis muestras proteicas por duplicado en un gel de acrilamida y transferirse a una membrana tal como nitrocelulosa o PVDF. Una transferencia se detecta con el anticuerpo para polipéptido de tipo Tp17 y una transferencia se detecta con anticuerpo para una proteína de control. Estos anticuerpos primarios se detectan después, por ejemplo, con anticuerpos secundarios marcados. Como alternativa, los anticuerpos específicos para una proteína de interés y una proteína de control se marcan cada uno con un colorante fluorescente diferente y se hacen reaccionar con la misma transferencia simultáneamente. La intensidad de fluorescencia de cada colorante se mide y la relación de la intensidad indica la relación de las dos proteínas.

40 Una transferencia de Far Western implica la inmovilización de una proteína en un soporte sólido, explorar el soporte con un ligando que es probable que se una directamente a la proteína e inmunodetección de la proteína-ligando unidos. Se muestra una transferencia de Far Western ejemplar en la Figura 5 y se describe en detalle en el Ejemplo 2.

45 Para inmunohistoquímica, pueden tratarse secciones titulares por duplicado con anticuerpos específicos para un polipéptido de interés y un polipéptido de control. Estos anticuerpos primarios pueden marcarse directamente o pueden marcarse con anticuerpos secundarios adecuados. La intensidad de tinción puede medirse con una cámara de dispositivo acoplado a carga (CCD) y las proteínas pueden cuantificarse. La relación de la intensidad de tinción indica la relación de las cantidades de proteína. Como alternativa, puede teñirse una sección única con ambos anticuerpos si los anticuerpos se han marcado con diferentes marcadores fluorescentes.

50 También se conocen bien en este campo técnicas de transferencia puntual/por ranuras. Por ejemplo, pueden aplicarse puntualmente cantidades iguales de una muestra biológica que contenga anticuerpo de polipéptido de tipo Tp17, anticuerpo del complejo de polipéptido de tipo Tp17-lisozima o anticuerpo de lisozima directamente sobre una membrana y detectarse con polipéptido de Tp17, lisozima y/o el complejo de polipéptido de tipo Tp17-lisozima, como se ha descrito anteriormente. Las sondas pueden marcarse o puede usarse un ligando secundario.

55 Se conocen en la técnica muchos tipos de métodos basados en biosensores y pueden usarse para detectar y cuantificar anticuerpos anti-polipéptido de tipo Tp17, anticuerpos anticomplejo de polipéptido de tipo Tp17-lisozima o anticuerpos anti-lisozima. Por ejemplo, las muestras que contienen anticuerpos específicos para polipéptido de tipo Tp17 y/o lisozima pueden unirse a la superficie del biosensor de modo que cuando el polipéptido de tipo Tp17 y/o lisozima se une a la superficie recubierta se produzca un cambio detectable en alguna propiedad de la superficie. Los biosensores miden, por ejemplo, cambios de masas en la superficie, cambios de propiedades eléctricas o cambios de las propiedades ópticas. Cada uno de estos métodos se conoce bien en la técnica y son adecuados para su uso en los presentes métodos.

65 Están disponibles métodos basados en biosensores comerciales de, por ejemplo, Biacore (Piscataway, NJ) y son

5 adecuados para su uso en la presente invención para detectar y cuantificar cambios en los niveles de anticuerpos para polipéptido de tipo Tp17 y/o lisozima. Véase también, por ejemplo, los métodos de detección de proteínas descritos en la patente de Estados Unidos N° 6.225.047, cuyos contenidos se incorporan por la presente por referencia en su totalidad y Davies *et al.* (1999) *Biotechniques* 27:1258-61. Están disponibles métodos de detección de microplacas de proteínas comerciales de CIPHERGEN (Fremont, CA). La invención puede aumentarse de escala para detectar o diferenciar entre dos o más patógenos, por ejemplo, para determinar si una cepa de bacteria es una cepa resistente a fármacos o es incapaz de unirse a o inhibir lisozima.

10 En otra realización, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento pueden ser inmunoensayos competitivos, que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un inmunoensayo de tipo sándwich competitivo para medir el nivel de anticuerpo para un polipéptido de tipo Tp17 y/o lisozima en el que se usan anticuerpos de polipéptido de tipo Tp17 conocidos para competir con el anticuerpo de polipéptido de tipo Tp17 en la muestra por unión con el polipéptido de tipo Tp17. Por ejemplo, pueden incubarse diluciones en serie de anticuerpos de polipéptido de tipo Tp17 conocidos con la muestra o con el polipéptido de tipo Tp17 antes de la adición al ensayo.

15 También pueden usarse métodos de espectrometría de masas para detección de proteínas para detectar y cuantificar cambios en los niveles de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, para polipéptido de tipo Tp17 y/o lisozima en una muestra, por ejemplo. Véase, por ejemplo, los métodos descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.719.060; 5.894.063; y Shimizu *et al.* (2002) *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 25:776:15-30; Kiernan *et al.* (2002) *Anal. Biochem.* 301:49-56; y Pramanik *et al.* (2002) *Protein Sci.* 11:2676-87. También están disponibles métodos de detección de proteína basados en espectrometría de masas de CIPHERGEN (Fremont, CA).

Muestra biológica

25 La muestra analizada o tratada usando cualquiera de las composiciones y métodos de la invención puede comprender una muestra corporal tal como sangre, suero, plasma, lágrimas, saliva, líquido nasal, esputo, líquido ótico, líquido genital, líquido mamario, calostro, leche, líquido placentario, sudoración, líquido sinovial, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo, bilis, fluido gástrico, líquido gastrointestinal, exudado, trasudado, líquido pleural, líquido pericárdico, semen, materia fecal, líquido de las vías respiratorias superiores, líquido peritoneal, líquido recogido de un sitio de inflamación u otra respuesta inmune, líquido recogido de un sitio de recogida agrupado, lavado bronquial, orina, humor acuoso, material de biopsia, material del rumen de un animal rumiante, muestra de células nucleadas, líquido asociado con una superficie mucosa, por ejemplo. Como alternativa, las composiciones y métodos de acuerdo con la invención pueden realizarse en muestras de células secas (por ejemplo, pelo o piel) o muestras de biopsia de cualquier tejido en el que los genes de interés o los anticuerpos se expresen o se depositen.

Otras muestras

35 Como se indica en el presente documento "muestra" también significa cualquier muestra de diagnóstico, experimental o clínica que pueda sospecharse que contiene lisozimas o un polipéptido de tipo Tp17, o que requiera de otro modo ensayo o tratamiento con respecto a la presencia de lisozima o un polipéptido de tipo Tp17, o anticuerpo para el mismo, tal como un frasco de cultivo, cubeta, hisopo, instrumento médico (por ejemplo, instrumento quirúrgico). Una muestra también puede ser un cultivo de células o líquidos (por ejemplo, aspirado de garganta, muestra de líquido cefalorraquídeo, hemocultivo). Una muestra puede ser una preparación patógena, tal como, por ejemplo, una bacteria, un virus, un parásito, un plásmido, un micoplasma, un agente micótico (por ejemplo, hongo, levadura) o preparación priónica. La muestra puede ser un agente líquido o sólido, tal como un alimento, una medicina, un implante, un injerto, un medio de cultivo tisular o celular, una muestra de agua, u otra solución, reactivo o aparato para el que se desee o requiera esterilidad.

40 Las composiciones y métodos pueden usarse para diagnosticar contaminación o infección por patógeno, por ejemplo, enfermedades relacionadas con patógenos tales como, por ejemplo, sífilis, infección por VIH, herpes genital, peste bubónica, disentería, shigelosis, caries dental, infección por *E. coli*, fibrosis quística, tuberculosis, cólera, infecciones estreptocócicas del grupo A y grupo B, infecciones estafilocócicas, úlcera gástrica, tos ferina, clamidiosis, brucelosis, otitis media, meningitis, infección gripal, malaria, salmonelosis, gonorrea, vibriosis, colibacilosis, neumonía, bronquitis, síndrome respiratorio agudo grave. En una realización, las composiciones y métodos de la invención son útiles en el diagnóstico de enfermedades de almacenamiento citoplásmico tales como enfermedades de almacenamiento lisosomal.

50 Además, las composiciones y métodos de la invención pueden usarse para diagnosticar enfermedades tales como cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad inflamatoria, enfermedad de Alzheimer, amiloidosis renal, leucemia, enfermedad de Crohn y alergia.

Células

65 La invención puede requerir células para la preparación o ensayo de péptidos patógenos, por ejemplo. Las líneas celulares animales o bacterianas permanentes o primarias cultivadas puede ser: células primarias (incluyendo, pero

sin restricción, monocitos, sinoviocitos, fibroblastos y células endoteliales) derivadas del mismo sujeto que la muestra de fluido o derivados de otro individuo; líneas celulares permanentes de una serie de orígenes tisulares y de órganos (incluyendo, pero sin restricción, líneas celulares disponibles de depósitos de acceso público tales como la colección americana de cultivos tipo); o líneas celulares primarias o permanentes que se han transfectado de forma estable con construcciones “promotor-lectura”.

Se conocen bien en este campo técnicas de cultivo de células bacterianas. Por ejemplo, pueden cultivarse células bacterianas en caldo 2XYT en un agitador a 37 °C. Los métodos para cultivar bacterias transformadas con un plásmido o virus también pueden incluir cultivo en agentes selectivos tales como ampicilina u otro antibiótico. También se conocen en la técnica preparaciones de células y lisados celulares, así como purificación de proteínas y ácidos nucleicos.

La práctica de la presente invención puede emplear, a no ser que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de las experiencias de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1989), 2ª Ed., Sambrook *et al.* (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Capítulos 16 y 17; Hogan *et al.* (1986) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; patente de Estados Unidos Nº 4.683.195; DNA Cloning, Volúmenes I y II (1985) Glover (Ed.); Oligonucleotide Synthesis (1984) Gait (Ed.); Nucleic Acid Hybridization (1984) Hames y Higgins (Eds.); Transcription and Translation (1984) Hames & Higgins (Eds.); Culture Of Animal Cells (1987) Freshney, Alan R. Liss, Inc.; Immobilized Cells And Enzymes (1986) IRL Press; Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (1987) Miller y Galos (Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory; Methods In Enzymology, Volúmenes 154 y 155, Wu *et al.* (Eds.) Academic Press Inc., N.Y.; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (1987) Mayer y Walker (Eds.) Academic Press, Londres; Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (1986) Weir y Blackwell (Eds.).

Los métodos descritos en el presente documento son útiles por lo tanto como una herramienta de diagnóstico y pronóstico, como un medio para tratar o inmunizar contra enfermedad, para supervisar la progresión y resolución de la enfermedad, para rastrear la respuesta o falta de ella, para terapia, para evaluar la eficacia de la medicación alternativa o conjunta, y para establecer la dosis terapéutica correcta de una medicación. Los métodos descritos en el presente documento también pueden usarse, en el contexto de búsqueda y desarrollo de fármacos, para evaluar la eficacia potencial y efectos secundarios de fármacos de investigación y aprobados en muestras biológicas recogidas en el transcurso de ensayos animales y/o ensayos clínicos de fase I, II, III y IV y/o estudios después de la comercialización. La práctica de la invención se entenderá más completamente a partir de los siguientes ejemplos, que se presentan en el presente documento para fines solamente ilustrativos, y no deberían interpretarse como limitantes de la invención de ningún modo.

EJEMPLO 1: La lisozima de pollo se purifica conjuntamente con formas recombinantes del antígeno de *Treponema pallidum* de 17 kDa

En el contexto de purificar antígeno Tp17 de *T. pallidum* recombinante, derivado de *E. coli* (GST-Tp17 o Tp17-HIS), una proteína se purificó conjuntamente de forma reproducible con Tp17. Esta proteína “contaminante”, que tenía un peso molecular de 14 kDa y no reaccionaba con un suero policlonal anti-Tp17, se identificó como lisozima de pollo como se describe posteriormente.

Se separó una fracción proteica que contenía ambas entidades (Tp17 y el “contaminante”) por PAGE-SDS, se escindió del gel y se sometió a secuenciación de aminoácidos N terminal. El experimento produjo secuencias peptídicas N terminales cortas (6-7 aminoácidos) que coincidían perfectamente con la secuencia esperada del antígeno Tp17 de *T. pallidum* o lisozima de pollo, que se incluyó en el tampón de resuspensión de pasta celular para facilitar la lisis de células bacteriana. Estas observaciones sugirieron que Tp17 interacciona físicamente con la lisozima de pollo. Se presentan posteriormente protocolos experimentales correspondientes a la purificación de GST-Tp17 y Tp17-HIS, así como experimentos de microsecuenciación.

Cromatografía de GST-Tp17

La *E. coli* recombinante DH5 α que contenía pGEX2T-Tp17 (Akins *et al.* (1993) Infect Immun. 61:1202-1210) (Figura 6) se cultivó en un fermentador de 5 litros en caldo 2xYT (Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª, Chris Nolan (Ed.) Cold Spring Harbor Press.) con ampicilina 100 μ g/ml (Roche Diagnostics, Barcelona, España). El cultivo se indujo con IPTG 0,3 mM (Roche Diagnostics Mannheim, Alemania) durante cuatro horas. Las células se recogieron y se resuspendieron en Tris 50 mM (pH 8,0), NaCl 85 mM, EDTA 2 mM, polioxietileno 10 tridecil éter 1%, que contenía cóctel inhibidor de proteasa A (1 ml/g de pasta celular, Sigma-Aldrich, Madrid, España) y lisozima de pollo 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Después de incubación durante 50 minutos, las células se sonicaron y se centrifugaron a 28.000 g. El GST-Tp17 recombinante se purificó del sobrenadante por cromatografía de intercambio iónico (Q Sepharose XL, Amersham Biosciences, Cerdanyola, España). El flujo

continuo se purificó adicionalmente por cromatografía de afinidad de glutatión (glutatión sepharose FF, Amersham, Cerdanyola, España). Se usó un tampón de glutatión reducido 100 mM para eluir el GST-Tp17. Las fracciones recogidas se analizaron por electroforesis en gel. Se realizó otro proceso de purificación sin usar lisozima siguiendo el mismo protocolo.

5

Cromatografía de Tp17-HIS

La secuencia génica que codifica la secuencia codificante de proteína Tp17 madura (incluyendo los restos 23 a 156 de la secuencia de Tp17 depositada con el número de referencia de NCBI P29722) se amplificó por PCR usando el vector pProExHT-Tp17 (Dr. Norgard, Universidad de Dallas, Texas, Estados Unidos) como un molde. Se realizó amplificación por PCR usando un kit de sistema de PCR de alta fidelidad de expansión (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y los oligonucleótidos P17-NdeI (5'-AGA TAT TAT ACA GGT CTC GTG GTG CAC AAC CGT TCC ACG CGC CGG GAA GGC CAA -3') (SEC ID N°: 33) y P17 inv1-(XhoI) (5'-ATG TAG ACG CGA TTA GAG -3') (SEC ID N°: 34) en las condiciones recomendadas por el proveedor (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las condiciones de termociclación fueron como sigue: un ciclo de desnaturalización (1 minuto a 94 °C) seguido de 30 ciclos de amplificación (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C). El amplicón de PCR resultante (~ 300 pb) se purificó usando el sistema de purificación Nucleotrap (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Se digirieron 1 µg de fragmento de PCR purificado y 1 µg de plásmido pET24a purificado cada uno con 10 unidades de NdeI y 10 unidades de XhoI usando las condiciones recomendadas por el proveedor (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los fragmentos restringidos se separaron a través de un gel de agarosa al 0,8% (Sambrook *et al.* (1989)) y fragmentos correspondientes a Tp17 (~ 300 pb) y vectores pET24a (~ 5300 pb) se escindieron y se purificaron en gel usando el sistema de purificación Nucleotrap (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Ambos fragmentos se ligaron usando ADN ligasa T4 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) usando las condiciones recomendadas por el proveedor. La reacción de ligación se usó después para transformar *E. coli* químicamente competente TOP 10 (Invitrogen SA, Barcelona, España) y se seleccionaron transformantes en placas LB (Sambrook *et al.* (1989)) complementadas con ampicilina 100 µg/ml (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se preparó ADN plasmídico de 10 clones individuales y se analizó por digestión con endonucleasa de restricción usando NdeI y XhoI. Ocho de diez clones contenían el plásmido recombinante pET24a-Tp17 correcto. La secuencia de un clon plasmídico se verificó por secuenciación de ADN (centro de secuenciación de ADN, UAB, Barcelona, España) y se usó posteriormente para transformar la cepa de expresión de *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta (Novagen, Madison, WI). La cepa resultante se nombró EcBK633 (véase Figura 7).

La *E. coli* recombinante EcBK633 se cultivó en un biorreactor de 5 litros en caldo 2xYT con ampicilina (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El cultivo se indujo con IPTG 1 mM (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) durante cuatro horas. Las células se recogieron y se resuspendieron en Tris 50 mM (pH 8,5) que contenía inhibidores de proteasa (Sigma-Aldrich Madrid, España) y lisozima de pollo 0,6 mg/ml (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Después de incubación durante 45 minutos, las células se sonicaron y se centrifugaron a 30.100 g. El Tp17-HIS recombinante se purificó del sobrenadante por cromatografía de afinidad de iones metálicos, usando resina cargada con níquel (Chelating HP, Amersham, Cerdanyola, España) y un gradiente de elución de imidazol 10-200 mM (Merck, Darmstadt, Alemania) e imidazol 500 mM como se recomendó por el proveedor. Las fracciones recogidas se analizaron por electroforesis en gel y transferencia de western.

Electroforesis y análisis de transferencia de western

Las fracciones cromatográficas y marcadores de peso molecular de proteínas (Véase Blue Plus™ II, Invitrogen, Barcelona, España) se separaron de forma electroforética a través de dos geles de SDS-PAGE al 15% idénticos como se describe en Sambrook *et al.* (1989). Posteriormente, se tiñó un gel con azul brillante de Coomassie R250 (Merck, Darmstadt, Alemania) para detectar proteína total. Como se muestra en la Figura 8A, se observaron dos bandas principales (14 kDa y 17 kDa) en la fracción correspondiente a la proteína purificada Tp17. Las proteínas en el otro gel se electrotransfirieron a una membrana de PVDF Immobilon™ P (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts) como se recomendó por el proveedor. La membrana se incubó después durante 1 hora a temperatura ambiente (18-22 °C) en 5 ml de Blotto™ (BioRad, Hercules, California) que contenía PBS, Tween 0,05% p/v y leche desnatada seca 10% p/v (PBST). La membrana se procesó después como sigue: (1) tres lavados de 10 minutos con PBST, (2) incubación de 1 hora a temperatura ambiente (18-22 °C) en presencia de 10 ml de suero humano de un paciente con sífilis diluido 1/200 en Blotto™, (3) tres lavados de 10 minutos con PBST, (4) 1 hora de incubación a temperatura ambiente con 10 ml de un suero policlonal antihumano de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (BioRad, Hercules, California, Estados Unidos) diluido 1/2000 en PBST, (5) tres lavados de 10 minutos con PBST y (6) una incubación final con 5 ml de sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina NBT/BCIP (Sigma-Aldrich, Madrid, España) hasta desarrollo del color. Como se muestra en la Figura 8B, este ensayo detecta la unión de la IgG humana para la proteína de 17 kDa (Tp17-HIS) pero no la de 14 kDa.

Secuenciación N terminal

La fracción cromatográfica que contiene el Tp17-HIS purificado con la proteína contaminante (14 kDa) y un marcador de peso molecular proteico (SeeBlue Plus™ II, Invitrogen SA, Barcelona, España) se separó por

electroforesis a través de un gel de SDS-PAGE al 15% como se describe en Sambrook *et al.* (1989). Posteriormente, las proteínas en el gel se electro-transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon™ P (Millipore Corp., Bedford, MA) usando las directrices de los proveedores. La membrana se tiñó con azul brillante de Coomassie R250 y las dos bandas se cortaron y secaron para análisis de secuenciación. El análisis N terminal por degradación de Edman automática se realizó en un secuenciador Beckman LF3000 con un analizador de aminoácidos PTH (System Gold, Beckman Coulter, Fullerton, California).

Las secuencias obtenidas fueron:

NH₂- VS (C) TTV -COOH para la proteína de 17 kDa (SEC ID N°: 35).
 NH₂- KVFGR (C)ELAA -COOH para la proteína de 14 kDa (SEC ID N°: 36).

Como se muestra en la Figura 8B, la secuencia N terminal de la proteína de 17 kDa correspondía al Tp17 de *Treponema pallidum* y la secuencia proteica de 14 kDa correspondía a la lisozima de pollo.

EJEMPLO 2: Detección de Far Western de la unión de Tp17 con lisozima de pollo y humana

La observación de que el antígeno proteico de 17 kDa (Tp17) de *T. pallidum* se purifica conjuntamente con lisozima de pollo sugiere fuertemente una interacción física directa entre ambas proteínas. Para ensayar esta hipótesis, se realizó un ensayo de interacción de proteína-lisozima de transferencia de far western. El ensayo se resume en la Figura 5 y comprende generalmente las siguientes tres etapas: (1) inmovilización de lisozima purificada en una membrana, (2) exploración de una membrana con un ligando que probablemente se une directamente a la lisozima; y (3) inmunodetección de la lisozima-ligando unidos. Se presenta un procedimiento experimental detallado a continuación.

Detección por transferencia de far western de interacciones proteicas lisozima-Tp17

Se obtuvieron lisozima de clara de huevo de pollo purificada y lisozima de leche materna humana de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Se separaron dos series de fracciones en alícuotas que contenían 1 µg, 5 µg y 10 µg de lisozima purificada y un marcador de peso molecular proteico (SeeBlue Plus™ II, Invitrogen SA, Barcelona, España) por electroforesis a través de un gel SDS-PAGE al 4-12% usando las condiciones recomendadas por el proveedor (Invitrogen). El gel se procesó después para transferencia de western como se describe en Sambrook *et al.* (1989) de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, y las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF Immobilon™ P (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts). La presencia de lisozima inmovilizada en la membrana de PVDF se evaluó por tinción durante 1 minuto con tinción de Ponceau S (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y después se destiñó por lavado vigoroso durante 5 minutos con agua desionizada. La membrana se dividió en dos, conteniendo cada parte una escalera proteica y tres cantidades de lisozima de pollo o humana (1 µg, 5 µg y 10 µg por carril). Cada membrana se incubó después durante 16 horas a 4 °C en 5 ml de TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween 20™ 0,05% peso/volumen) complementado con leche en polvo desnatada Sveltesse™ 5% (peso/volumen) (Nestlé, ESPAÑA, Barcelona, España) (para realizar leche-TBST). Las membranas se procesaron después por separado como sigue: (1) tres lavados de 1 minuto con 10 ml de TBST, (2) incubación de 1 hora a temperatura ambiente (18-22 °C) en presencia de 10 ml de proteína de fusión GST-Tp17 100 mg/ml (Akin *et al.* (1993)) o una proteína de control GST-TP47, (Hsu *et al.* (1989) Infect. Immun. 57:196-203; Weigel *et al.* (1992) Infect. Immun. 60:1568-1576) (3) tres lavados de 10 minutos con 5 ml de TBST, (4) incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con 10 ml de un suero de cabra policlonal anti-GST (Amersham Biosciences, Cerdanyola, España) diluido 1/7500 con leche TBST, (5) tres lavados de 10 minutos con 5 ml de TBST a temperatura ambiente, (6) incubación de 1 hora a temperatura ambiente con 10 ml de un conjugado de fosfatasa alcalina, suero policlonal de conejo anti-cabra (Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) diluido 1/5000 en leche-TBST, (7) tres lavados de 10 minutos con 5 ml de TBST y (8) incubación de 3 minutos con 5 ml de sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina nitroazul tetrazolio/bromo cloro indolil fosfato (NBT/BCIP) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) hasta el desarrollo del color.

El ensayo anterior detectó la unión de la proteína de fusión GST-Tp17 con lisozima tanto de pollo como humana (banda de 14 kDa en las Figuras 9B y 9D, respectivamente). Además, la unión de GST-Tp17 con lisozima es fuerte puesto que resistió numerosos lavados en presencia de detergente (Tween 20™ 0,05%). No se detectó señal cuando la membrana se incubó con antígeno TP47-GST de control (Figura 9A y 9C), lo que demuestra que la interacción entre Tp17 y la lisozima es específica y no implica el resto de GST, que está compartido tanto por GST-Tp17 como por GST-TP47. Estos resultados demuestran que (i) el antígeno Tp17 de *T. pallidum* se une fuertemente y específicamente con lisozima humana y de pollo, y (ii) esta propiedad está contenida entre los restos 22 y 156 de Tp17 (los números se relacionan con la secuencia del péptido de Tp17 depositada con el número de referencia P29722). Este ensayo se usa para caracterizar proteínas de unión a lisozima nuevas así como para identificar mutantes de lisozima incapaces de unirse al inhibidor afín de lisozima. Por el contrario, este ensayo se usa para explorar con respecto a mutantes de Tp17 incapaces de unirse o asociarse con lisozima. Este ensayo también se usa para explorar con respecto a las sustancias (por ejemplo, péptidos, proteínas, fármacos, anticuerpos, ácidos nucleicos, PNA, etc.) que interfieren con la unión de lisozima con su inhibidor afín.

EJEMPLO 3: El antígeno de proteína Tp17 de *T. pallidum* inhibe la actividad antibacteriana de lisozima de pollo y humana

Las lisozimas son agentes antibacterianos bien caracterizados hallados en superficies mucosas y en fluidos biológicos. Debido a su potente actividad enzimática acetil-muramidasa, las lisozimas son capaces de hidrolizar peptidoglicanos de la pared celular, destruyendo de este modo muchas bacterias patógenas. La fuerte unión entre Tp17 y lisozima humana sugirió que esta unión puede alterar la actividad antibacteriana de la lisozima. Esta hipótesis es coherente con la observación de que (i) *T. pallidum* es un patógeno mucoso y (ii) está en contacto con lisozima humana en su nicho ecológico, a lo largo de su ciclo de vida infeccioso.

Para ensayar esta hipótesis, la actividad antibacteriana de lisozima tanto humana como de pollo se ensayó, en presencia o ausencia de GST-Tp17, usando un kit de ensayo de lisozima EnzCheck® (Molecular Probes, Eugene, Oregón). El ensayo comprende el uso de células bacterianas *Micrococcus lysodeikticus* marcadas con fluoresceína como un sustrato fluorescente de lisozima. En esta bacteria Gram positiva, la capa de peptidoglicano es directamente accesible a lisozima, y se ha marcado con fluoresceína de modo que la fluorescencia se interrumpe de forma natural. Tras la hidrólisis de lisozima, la interrupción se detiene y se libera fluoresceína en una cantidad que es proporcional a la actividad de lisozima. Se usó el siguiente protocolo experimental.

Ensayo de inhibición de lisozima

Una reacción de 100 µl típica consistió en 25 µl de solución de lisozima (10 unidades para lisozima de pollo o 50 unidades para lisozima humana, disuelta en agua desionizada), 25 µl de la solución proteica de ensayo y 50 µl de una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* marcado con fluoresceína (50 pg/ml). La reacción se incubó durante 45 minutos a 37 °C y se midió la fluorescencia ($\lambda_{exc.} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{emi} = 520 \text{ nm}$) usando un lector de placas multipocillo de fluorescencia modelo FLx800 (Bio Tek Instruments, Winoosky, Vermont) equipado con software de adquisición de datos KC junior (Bio TEK Instruments, Winoosky, Vermont). Cada punto experimental se expresó como la media y desviación típica correspondiente a la lectura de tres pocillos independientes. Se usaron pocillos que contenían 50 µl de agua desionizada y 50 µl de suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* marcado con fluoresceína como un blanco. Se usaron diluciones en serie dos veces de proteína de ensayo para variar la concentración de la proteína de ensayo de 83,5 a 1,3 µg/pocillo.

Como se muestra en la Figura 10, la actividad acetil muramidasa de lisozima tanto humana como de pollo se inhibió fuertemente (>85% de inhibición) mediante la adición de tan poco como 1,3 µg/pocillo de la proteína de fusión GST-Tp17. Por el contrario, la proteína de fusión GST-Tp47 de control no ejerció ningún efecto inhibitorio en la actividad enzimática acetil muramidasa de lisozima humana o de pollo. Estos datos demuestran que Tp17 inhibe específicamente la actividad antibacteriana de lisozima tanto humana como de pollo y no depende del resto de GST. Adicionalmente, este ensayo se usa para caracterizar nuevos inhibidores de lisozimas así como para identificar mutantes de lisozima incapaces de unirse a su inhibidor afin y/o que son insensibles a inhibición por Tp17, Ivy u otras proteínas de tipo Tp17. El ensayo también proporciona una exploración útil para sustancias (por ejemplo, péptidos, proteínas, fármacos, anticuerpos, ácidos nucleicos o PNA, etc.) que interfieren con la inhibición de la actividad antibacteriana de la lisozima.

EJEMPLO 4: Determinante estructural requerido para unión de Ivy de *Escherichia coli* con lisozima de pollo

Para identificar la región o las regiones polipeptídicas implicadas en la unión de Tp17 de *T. pallidum* con lisozima y la inhibición de la actividad acetil muramidasa de lisozima, se buscaron en bases de datos biológicas polipéptidos que se había descrito previamente que se unían a e inhibían la actividad acetil muramidasa de lisozima. Una búsqueda en la base de datos PubMed del Instituto Nacional de Salud, usando los términos "lisozima" e "inhibidor" como palabras clave, identificó la proteína de *Escherichia coli* llamada Ivy (que significa inhibidor de lisozima de vertebrados), que se ha indicado que se une a e inhibe la actividad acetil muramidasa de lisozima tanto humana como de pollo (Monchois *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:18437-18441)). Esta proteína fue de interés porque (i) es de tamaño similar (polipéptido maduro de 14 kDa) a Tp17 maduro (polipéptido maduro de 15 kDa) y (ii) estaba disponible una estructura cristalina de Ivy en complejo con lisozima de pollo en el banco de datos de proteínas PDB en la colaboración de investigación para bioinformática estructural (RCSB) con el número de referencia 1 GPQ. Sin embargo, como se representa en la Figura 11A, la proteína Ivy comparte menos del 21% de identidad de secuencia de aminoácidos con Tp17 y no pudo deducirse ningún motivo peptídico evidente a partir de los alineamientos de secuencia polipeptídica. La estructura cristalina tridimensional de Ivy/lisozima de pollo se examinó con respecto a restos localizados en la interfaz entre ambas moléculas. Se usó el visor de estructura molecular tridimensional Cn3D para analizar las interacciones moleculares entre Ivy y lisozima de pollo. En los siguientes ejemplos, todos los números se refieren y corresponden a los datos archivados con los números de referencia de NCBI siguientes: P00698 para lisozima de pollo, NP_000230 para lisozima humana, P45502 para Ivy de *E. coli* y P29722 para Tp17 de *T. pallidum*.

Como se representa en la Figura 11B, se identificaron tres zonas de contacto posible de lisozima de pollo con Ivy. Los tramos peptídicos correspondientes son:

Péptido I: NH₂-52QGHKLDPAWVMKGGTYTP₆₇-COOH (SEC ID N° 37)

Péptido II: NH₂-85CKPHDCG₉₁-COOH (SEC ID N°: 38)

5

Péptido III: NH₂-145GSLENHPDGFN₁₅₅-COOH (SEC ID N° 39)

10

El péptido II presentó una estructura de tipo dedo compuesta de un enlace disulfuro cys-cys cerrando en ambos extremos un bucle peptídico que comprendía un motivo KPHD (SEC ID N°: 40; Figura 14A). Un análisis refinado del aminoácido presente en este bucle reveló dos interacciones electrostáticas no covalentes fuertes: entre H_{88-ivy} y E_{53-chkclLys}, y entre D_{89-ivy} y R_{132-chkclLys}.

15

20

El átomo de nitrógeno de H_{88-ivy} interactuó con el átomo de oxígeno de E_{53-chkclLys} y el átomo de oxígeno de D_{89-ivy} interactuó con el átomo de nitrógeno de R_{132-chkclLys} (Figura 12). Usando el software informático 3-D Mol viewer (grupo vector NTI 8.0, Informax, Frederick, Maryland), se midió la distancia entre centros atómicos a 2,56 Å (1 angstrom = 10⁻¹⁰ metros) en la interacción H_{88-ivy}/E_{53-chkclLys} y 2,46 Å en la interacción D_{89-ivy}/R_{132-chkclLys}. La naturaleza (atracción electrostática entre restos de cadenas laterales) y la proximidad (en el intervalo 2,4-3,4 Å) de centros atómicos indicaron la presencia de una clase particular de enlace no covalente denominada "puente salino". Esta observación fue interesante porque la mayoría de los puentes salinos aparecen en depresiones relativamente sin agua o en interfaces biomoleculares en las que se excluye el agua (Petsko *et al.* (2003) Protein Structure and Function. Lawrence y Robertson (Eds.) New Science Press Ltd., Reino Unido).

25

30

35

Las Figuras 13A-13D ilustran que el puente salino que implica D_{89-ivy} ··· R_{132-chkclLys} se expuso parcialmente a las moléculas de agua del disolvente (Figuras 13C y 13D), mientras que el puente salino que implica H_{88-ivy} ··· E_{53-chkclLys} estaba completamente internado y en consecuencia protegido del disolvente por el interfaz proteína-proteína (Figuras 13A y 13B). Dado que la hidratación de un puente salino reduce su fuerza de enlace, es menos probable que el puente salino H_{88-ivy} ··· E_{53-chkclLys} se rompa por el disolvente que el puente salino D_{89-ivy} ··· R_{132-chkclLys}. Resulta interesante que las Figuras 13A y 13B también muestran que el puente salino H_{88-ivy} ··· E_{53-chkclLys} bloquearon la accesibilidad al ácido glutámico 53 (E₅₃) de lisozima de pollo. El ácido glutámico número 53 (E₅₃) y ácido aspártico 71 (D₇₁) en la secuencia de lisozima de longitud completa se corresponden a los restos E₃₅ y D₅₃ de la cadena peptídica de lisozima madura. Como se representa en las figuras 3A y 3B, E₅₃ junto con D₅₃ en lisozima de pollo madura (o en lisozima humana) están conservados en todas las secuencias de lisozima conocidas y se cree que son los dos restos catalíticos requeridos para la hidrólisis del peptidoglicano (Malcolm *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos. 86:133-7).

40

Tomados juntos, estos datos demuestran que Ivy establece dos puentes salinos con lisozima: uno esencial para la especificidad y la estabilidad de la interacción (H_{88-ivy} ··· E_{53-chkclLys}) así como para la inhibición de actividad antibacteriana de lisozima por impedimento estérico, y el otro (D_{89-ivy} ··· R_{132-chkclLys}) implicado en un menor grado en la estabilización de la interacción lisozima/inhibidor. Debido a la estricta conservación de los restos E₃₅ y D₅₃/D₅₂ D₅₂ (la numeración se refiere a la secuencia de lisozima madura) entre especies, estas observaciones demuestran que Tp17 inhibe una amplia serie de, si no todas, las lisozimas.

45

EJEMPLO 5: Identificación de una secuencia peptídica consenso compartida por inhibidores proteicos de lisozimas de mamífero

50

El Ejemplo 4 demostró que la secuencia de péptido II NH₂-CKPHDCG-COOH (SEC ID N°: 38) es necesaria para unión a e inhibición de la actividad enzimática de lisozima de pollo. Un examen detallado de la secuencia del polipéptido Tp17 identificó dos secuencias candidatas que posiblemente median en la unión e inhibición de lisozima tanto de pollo como humana. Ambas secuencias, denominadas Tp17_pep1 y Tp17_pep2, se enumeran a continuación:

Tp17_pep1: NH₂-29C P H A G K A K A E K V E C₄₂-COOH (SEC ID N°: 41)

Tp17_pep2: NH₂-114K A P H E K E₁₂₀-COOH (SEC ID N°: 42)

55

60

Tp17_pep1 está cercanamente relacionado con el motivo NH₂-85CKPHDCG₉₁-COOH (SEC ID N°: 38) de la proteína Ivy de *E. coli* pero difiere en la presencia de un tramo de nueve aminoácidos que separa el resto de histidina del resto de ácido aspártico. Como se muestra en la Figura 14B, y como se encuentra para el motivo Ivy (Figura 14A), el enlace de las dos cisteínas flanqueantes probablemente pone los restos críticos de histidina y ácido aspártico en proximidad espacial estrecha, posiblemente en una configuración capaz de poner en contacto los restos E₅₃ y R₁₃₂ de lisozima. Aunque la función del posible bucle de 9 aminoácidos de Tp17 se desconoce en la actualidad, su composición sugiere que es altamente hidrófilo y probablemente inmunogénico. Los restos de lisina cargados positivamente contenidos en este bucle de 9 aminoácidos pueden contactar directamente con un área de superficie cargada negativamente de lisozima, proporcionando también un punto de anclaje adicional para fortalecer la unión. Alineando el péptido Tp17_pep1 con el motivo de unión a lisozima Ivy, se obtuvo la secuencia consenso CX₁PHX_rX₂C (SEC ID N°: 43), en la que X₁ es al menos un aminoácido, está ausente, o es un enlace peptídico, X_r

es de cero a nueve aminoácidos, o es un enlace peptídico, y X_2 es ácido glutámico o ácido aspártico.

Aunque carece de las dos cisteínas flanqueantes, el Tp17_peg2 también está cercanamente relacionado con el motivo $\text{NH}_2\text{-CKPHDCG-COOH}$ SEC ID N°: 38 de la proteína Ivy de *E. coli*, puesto que comparte los restos PH críticos seguidos de un residuo ácido (D/E). La compilación de datos estructurales, información bibliográfica y búsquedas de bases de datos revelaron un consenso de unión de lisozimas [CKVA] [ACK] P H [AED] [CGK] (SEC ID N°: 3), escrito usando el formato de sintaxis de patrón peptídico PROSITE universal.

Se determinaron secuencias de consenso adicionales y se escribieron usando el formato de sintaxis de patrón peptídico PROSITE universal, que está disponible a través de la base de datos SWISSProt del sistema de análisis de proteínas Expert, como sigue:

(a) $X_n\text{PHX}_n$ (SEC ID N°: 1), en la que X_n es al menos un aminoácido.

(b) $\text{CX}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{PHX}_4\text{X}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{X}_9\text{X}_{10}\text{X}_{11}\text{X}_{12}\text{X}_{13}\text{C}$ (SEC ID N°: 2), en la que X_1 a X_{13} son cualquier aminoácido, ningún aminoácido o un enlace peptídico.

(c) X_1CPHAG (SEC ID N°: 25), en la que X_1 es C o V.

Se ilustran realizaciones preferidas de polipéptidos de tipo Tp17 en las Figuras 1A, 1B y 2.

EJEMPLO 6: Identificación por ordenador de inhibidores y proteínas de unión a lisozima potenciales

Dada la baja conservación de secuencia peptídica global compartida por Ivy de *E. coli* y Tp17 de *T. pallidum*, probablemente estaban presentes motivos de unión a lisozima previamente no detectados en el genoma de otros organismos patógenos. Para ensayar esta hipótesis, las secuencias consenso definidas en el Ejemplo 5 se usaron para explorar bases de datos proteicas (Swiss-Prot, TrEMBL, TrEMBLnew y PDB) usando el algoritmo ScanProsite (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>). Las Figuras 1A, 1B y 2 ilustran que las proteínas que contienen un tramo peptídico ajustado dentro de las secuencias consenso estaban presentes en numerosos patógenos humanos y animales.

Las proteínas de *T. denticola*, *B. thetaiotaomicron*, *C. burnetti.*, *H. influenzae*, *N. meningitidis* serogrupo A y serogrupo B, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *H. ducreyi*, *S. typhi*, *L. pneumophila*, *S. aureus*, *N. gonorrhoeae*, y *B. pertussis*, pueden agruparse en la siguiente secuencia consenso: CX (0,3) PHX (0,14), que corresponde a Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Pro His Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ (SEC ID N°: 176) en la que Xaa es cualquier aminoácido o está ausente.

Las proteínas (de *P. gingivalis* y *H. pylori*) son variantes ligeramente atípicas que podrían agruparse en el siguiente consenso: CX (0,3) HX (0,10) C que corresponde a Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Cys (SEC ID N°: 175), en la que X es cualquier aminoácido o está ausente.

Este resultado es interesante porque todos estos organismos son patógenos de mucosa durante parte o la mayoría de su ciclo de vida infeccioso. Fue de interés particular la presencia de un motivo peptídico consenso en el extremo carboxilo terminal de la glicoproteína gJ del virus del herpes simple de tipo 2. Aunque la función de esta proteína en la actualidad se desconoce, está codificada por el gen Us5 presente en la región corta única (Us) del virus. Esta región se sabe que contiene la mayor parte de las proteínas del VHS implicadas en virulencia y que median en interacciones proteína-proteína con proteínas del hospedador humano, lo que apoya un papel de gJ en la patogénesis de infección por VHS. Resulta interesante que varias publicaciones han documentado que la lisozima tiene un fuerte efecto inhibitor tras infección por VHS2 y sus manifestaciones clínicas (Cisani *et al* (1989) Microbios 59:73-83; Oevermann *et al* (2003) Antivir Res 59:23-33). La proteína gJ de VHS-2 también es una proteína inhibidora/de unión a lisozima. Sorprendentemente, el motivo de unión a lisozima consenso está ausente de la proteína gJ de VHS-1 cercanamente relacionada (Figura 15). Esta observación proporciona una posible explicación para las observaciones clínicas que documentan un tropismo preferente pero no exclusivo de VHS-1 para la región orofacial mientras que VHS-2 se encuentra más frecuentemente en la mucosa genital rica en lisozimas (Lowhagen *et al.* (2002) Acta. Venereol 82:118-21; Bruisten *et al* (2003) Curr. Womens Health Report 3:288-98). Además, es interesante observar que dos patógenos genitales, un virus (VHS-2) y una bacteria (*T. pallidum*), comparten una secuencia peptídica inhibidora de lisozimas común.

Estas observaciones demuestran que gJ, solo o combinado con lisozima humana, es útil para diferenciar entre infecciones por VHS-1 y VHS-2 usando ensayos de diagnóstico serológicos o virológicos diferenciales. También proporciona composiciones y métodos para tratar infecciones por herpes simple con mutantes de lisozima que pueden escapar a la inhibición por gJ y/o miembros de las familias de Ivy y Tp17.

EJEMPLO 7: Identificación de mutaciones puntuales que desestabilizan la interacción proteína-proteína de lisozima/inhibidor

Se reconoce ampliamente que las interacciones proteína-proteína dependen de la complementariedad estructural y fisicoquímica. La irregularidad y heterogeneidad local de superficies proteicas permite la unión y asociación específica con ligandos y proporciona una base para la formación de estructura cuaternaria. El ajuste entre una superficie proteica y otra depende de más que su forma. Se extiende a los enlaces físico-químicos débiles que mantienen los complejos juntos: enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno, puentes salinos, interacciones electrostáticas de largo alcance e interacciones de Van der Waals. Esta propiedad de complementariedad es universal, bien entre una proteína y una molécula pequeña o bien entre una proteína y otro tipo de macromolécula (Petsko *et al.* (2003)).

Las mutaciones localizadas en la secuencia codificante de lisozima, seleccionadas de modo que no se vean afectadas las actividades acetil muramidasa y antimicrobiana, desestabilizan la interacción lisozimas/inhibidor y confieren a la resistencia a inhibición por proteínas patógenas tales como el antígeno Tp17 de *T. pallidum* o miembros de la familia Ivy. En una realización, la lisozima mutante conserva sustancialmente la actividad antimicrobiana deseada (por ejemplo, al menos aproximadamente 30%, 50% o incluso el 80%) de la lisozima natural correspondiente. Tales lisozimas mutantes representan nuevas e interesantes herramientas para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

También son sustitutos de lisozima de pollo derivada de huevo de gallina natural usada en preparaciones médicas disponibles en el mercado y tienen potencia y espectro de actividad mejorados. Se proporciona a continuación una lista de fármacos potenciales que probablemente se mejoren mediante el uso de tales mutantes de lisozima resistentes a inhibición:

Fármaco comercializado	Compañía farmacéutica
LYSOPAINE ORL	Boehringer Ingelheim
LYSO-6	UCB Health Care
GLOSSITHIASSE	Laboratoire Jolly-Jatel
CANTALENE	Laboratoire Cooper
HEXALYSE	Laboratoire Bouchara-Recordati

Tales mutantes de lisozima se obtienen usando enfoques tanto dirigidos como aleatorios.

Identificación dirigida de mutantes de lisozima resistentes a inhibición deducida de datos cristalográficos

Debido a su elevado punto isoeléctrico (pI), la lisozima humana (pI teórico = 9,28) y lisozima de pollo (pI teórico = 9,32) muestran una fuerte carga positiva a valores fisiológicos de pH comprendidos entre pH 3 y pH 7. Todos los inhibidores de lisozima conocidos tienen valores de pI bajos. Por ejemplo, las proteínas Ivy maduras (Monchois *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:18437-18441) de *E. coli* (pI = 5,51) y *P. aeruginosa* (pI = 5,69), así como la proteína Sic madura (Fernie-King *et al.* (2002) *Infect. Immun.* 70:4908-4916) de *S. pneumoniae* (pI = 4,39) están cargadas negativamente a pH fisiológico. Se ha presentado la hipótesis de que los restos de lisozima cargados positivamente que están presentes en el área de contacto lisozima/inhibidor son dianas atractivas para mutagénesis. La producción de un mutante de lisozima que tenga un área de contacto cargado negativamente podría producir una repulsión electrostática que evite la unión del inhibidor. Puesto que estas mutaciones no afectan a los restos catalíticos de lisozima, probablemente produzcan mutantes de lisozima activos, no inhibidos por patógenos.

La estructura cristalina de lisozima de pollo/Ivy de *E. coli* depositada con el número de referencia PDB 1GPQ, así como la estructura cristalina de Ivy de *P. aeruginosa* depositada con el número de referencia PDB 1HKE, se inspeccionaron con un visor molecular VNTI 3D. Se identificaron restos críticos en cada lisozima y se realizaron las siguientes mutaciones puntuales alterando la unión del inhibidor:

Posición en lisozima humana (NP_000230)	Posición en lisozima de pollo (P00698)	Mutada a:
Mutación que afecta a la carga de superficie de lisozima		
Lys ₁₉	Lys ₁₉	Asp, Glu o Gly
Arg ₂₃	Arg ₂₃	Asp, Glu o Gly

Lys ₅₁	Lys ₅₁	Asp, Glu o Gly
Arg ₁₃₁	Arg ¹³⁰	Asp, Glu o Gly
Arg ₁₃₃	Arg ¹³²	Asp, Glu o Gly
Mutación que impide de forma estérica la unión del inhibidor		
Gly ₅₅	Asn ₅₅	Phe, Trp o Tyr
Asn ₅₇	Asn ₅₇	Phe, Trp o Tyr
Asn ₁₃₂	Asn ₁₃₁	Phe, Trp o Tyr

Introducción de mutaciones puntuales por mutagénesis dirigida:

5 Se introdujeron mutaciones usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange® siguiendo las directrices recomendadas por el proveedor (Stratagene, La Jolla, CA). Brevemente, se usa el kit de mutagénesis dirigida QuikChange® para realizar mutaciones puntuales, cambiar aminoácidos y suprimir o insertar aminoácidos individuales o múltiples. El método de mutagénesis dirigida QuikChange® se realiza usando ADN polimerasa *PfuTurbo*® y un termociclador. La ADN polimerasa *PfuTurbo*® replica ambas hebras plasmídicas con alta fidelidad y sin desplazar los cebadores oligonucleotídicos mutantes. El procedimiento básico utiliza un vector de ADN bicatenario superenrollado (ADNbc) con un inserto de interés y dos cebadores oligonucleotídicos sintéticos que contienen la mutación deseada. Los cebadores oligonucleotídicos, cada uno complementario a hebras opuestas del vector, se extienden durante termociclación por ADN polimerasa *PfuTurbo*. La incorporación de los cebadores oligonucleotídicos genera un plásmido mutado que contiene muescas escalonadas. Después de la termociclación, el producto se trata con *Dpn* I. La endonucleasa *Dpn* I (secuencia diana: 5'-Gm 6 ATC-3') es específica para ADN metilado y hemimetilado y se usa para digerir el molde de ADN parental y para seleccionar ADN sintetizado que contiene mutaciones. El ADN aislado de casi todas las cepas de *E. coli* está metilado con dam y por lo tanto es susceptible de digestión por *Dpn* I. El ADN de vector con muescas que contiene las mutaciones deseadas se usa después para transformar células supercompetentes XL1-Blue. La pequeña cantidad de molde de ADN de partida requerida para realizar este método, la alta fidelidad de la ADN polimerasa *PfuTurbo*, y el bajo número de ciclos térmicos contribuyen todos a la alta eficacia de mutación y reducción del potencial para generar mutaciones aleatorias durante la reacción.

Aislamiento aleatorio de mutantes de lisozima resistentes a inhibición usando mutagénesis aleatoria mediada por PCR seguida de una exploración de dos híbridos microbiana

25 El sistema de dos híbridos se basa en la observación de que muchos activadores transcripcionales eucariotas consisten en dos dominios modulares físicamente separados: el dominio de unión a ADN (ADN-BD) y el dominio de activación (AD). El ADN-BD se une a una secuencia promotora específica y el AD dirige el complejo de ARN polimerasa II para transcribir el gen cadena abajo que confiere un fenotipo seleccionable/explorable. Los dominios actúan como módulos independientes: ninguno puede activar por sí solo la transcripción, pero cada dominio continúa actuando cuando se fusiona con otras proteínas. Los sistemas comerciales adecuados incluyen el sistema de dos híbridos listo para usar BacterioMatch® II (Stratagene, La Jolla, CA) o el sistema BD Matchmaker™ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA).

35 Se expresan lisozima y Tp17, una fusionada con el AD y el otro fusionado con ADN-BD. Si las dos proteínas interaccionan, los dominios ADN-BD y AD se ponen en proximidad estrecha y se activa la transcripción de un gen indicador. Dependiendo del sistema hospedador usado (por ejemplo, bacteriano, de levadura o mamífero), la interacción se detecta explorando con respecto a cambio estructural o fisiológico observable (por ejemplo, color de la colonia, emisión de fluorescencia, actividad enzimática, etc.). Por ejemplo, los dominios AD y ADN-BD se fusionan con lisozima y Tp17 respectivamente, se transforman en un hospedador microbiano apropiado (por ejemplo, bacteria o levadura), y los transformantes resultantes se exploran con respecto a la aparición de colonias azules indicativas de la activación del gen indicador (por ejemplo, beta-galactosidasa). Una vez que se han obtenido los clones, la secuencia de ADN plasmídico que porta la fase abierta de lectura de lisozima humana se somete a mutagénesis aleatoria mediada por PCR exhaustiva. Los transformantes resultantes se exploran visualmente con respecto a mutantes que hayan perdido el color azul y probablemente porten una o más mutaciones que alteren la interacción de lisozima/polipéptido de tipo Tp17. Después se extrae y secuencia el ADN plasmídico de los clones correspondientes.

EJEMPLO 8: La lisozima humana, pero no la de pollo, mejora la sensibilidad de kits de hemaglutinación usados para diagnóstico de sífilis

El Ejemplo 3 demuestra que, *in vitro*, la proteína de 17 kDa de *T. pallidum* Tp17 se une fuertemente a lisozima de pollo y humana, e inhibe fuertemente la actividad antibacteriana de ambas lisozimas. El siguiente experimento

- demuestra que estas interacciones de unión e inhibición también se producen *in vivo* durante la infección de superficies de mucosa humana por *T. pallidum*. Como consecuencia de la unión de Tp17 con lisozima, probablemente se formen nuevos epítomos y se expongan al sistema inmunitario. Los pacientes sífilíticos pueden inducir una respuesta inmune contra epítomos Tp17 así como contra epítomos compartidos por el complejo de Tp17-lisozima o incluso lisozima solamente, como se muestra en la Figura 4. Para ensayar esto, se añadió lisozima humana o de pollo a los reactivos de hemaglutinación usados para un ensayo de diagnóstico de sífilis para detectar los anticuerpos generados contra el complejo, mejorando de este modo la sensibilidad del ensayo. Se observó un aumento de la sensibilidad del ensayo de sífilis que era específico para lisozima humana.
- Se obtuvieron lisozima de clara de huevo de pollo purificada (L-6876) y lisozima de leche materna humana (L-6394) de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Se añadió una cantidad de lisozima de pollo o humana suficiente para mantener la proporción: 3 µg de lisozima/1 µg de Tp17 a un reactivo de hemaglutinación (Biokit SA, Lliça d'Amunt, España) preparado como sigue. Se seleccionaron glóbulos rojos de pollo, se fijaron y se recubrieron con GST-Tp17 (40 µg/ml) como se ha descrito previamente (Herbert *et al.* (1979) *Passive Haemagglutination With Special Reference to the Tanned Cell Technique*. Handbook of Experimental Immunology (vol. 1), páginas 20.1-22.20 (DMWeir (Ed.) Blackwell Scientific Publications (Oxford)); Stefen *et al.* (1951) *J. Exp. Med.* 93: 107-120; Hirata (1968) *J. Immunol.* 100: 641-46). Se complementó un lote de glóbulos rojos de pollo fijados, recubiertos con GST-Tp17 (5 ml), con 6 µl de lisozima de clara de huevo de pollo purificada (100 µg/µl). Se complementó otro lote de glóbulos rojos de pollo fijados, recubiertos con GST-Tp17 (1 ml), con 120 µl de lisozima de leche materna humana (1 µg/µl). Ambos lotes de glóbulos rojos sensibilizados se homogeneizaron por agitación magnética, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La sensibilidad de cada lote se evaluó después realizando una reacción de hemaglutinación usando un conjunto de sueros de sífilis humana, caracterizados para proporcionar una respuesta límite con otros reactivos de hemaglutinación comerciales.
- La reacción de hemaglutinación se realizó como sigue. En una placa de microtitulación de fondo redondo (en forma de U), se añadieron 25 µl de diluyente (Syphagen TPHA, Biokit SA, Barcelona, España) al pocillo 1, 100 µl al pocillo 2 y 25 µl a cada uno de los pocillos 3 a 8. Se añadieron 25 µl de muestra al pocillo 1. El contenido del pocillo 1 se mezcló y se transfirieron 25 µl al pocillo 2 y se mezcló. 25 µl del pocillo 2 al pocillo 3. Se realizaron después diluciones dos veces en serie a través del pocillo 8. Se descartaron 25 µl del pocillo 8. Se añadieron 75 µl del reactivo de hemaglutinación a los pocillos 3-8 (las diluciones finales de la muestra fueron 1/80 a 1/2560). Los contenidos de los pocillos se mezclaron usando un agitador durante al menos 30 segundos. La placa se recubrió y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los resultados del ensayo de leyeron aplicando los siguientes criterios. Se puntuó un resultado positivo cuando se observó un tapete de células suave que cubría el fondo completo del pocillo o cuando se observó un tapete de células suave que cubría parcialmente el fondo del pocillo y rodeado por un anillo fuerte de células. Un resultado se puntuó negativo cuando se observó un botón de células con una apertura central pequeña o cuando se observó un botón de células con o sin un orificio muy pequeño en el centro. El título de una muestra correspondía a la mayor dilución que proporcionó una reacción positiva. El punto de corte de esta técnica fue 1/80.
- Como se muestra en las Figuras 16A y 16B, la adición de lisozima humana al ensayo mejora la intensidad de hemaglutinación (es decir, se produjo hemaglutinación a diluciones mayores en presencia de lisozima humana en comparación con la ausencia de lisozima) de una manera dependiente de la concentración. Esta mejora parecía ser específica de lisozima humana debido a que la adición de lisozima de pollo no potenció la respuesta. La adición de lisozima humana mejoró drásticamente la sensibilidad del reactivo de hemaglutinación de sífilis y posibilitó la detección de anticuerpos que no se detectan en kits actualmente en el mercado.

EJEMPLO 9: La lisozima humana tanto natural como recombinante mejora la sensibilidad del ensayo de hemaglutinación usado para diagnóstico de sífilis

- La leche materna humana es una fuente natural de lisozima humana. Sin embargo, la purificación de lisozima de este fluido corporal es tediosa debido a: (i) su baja abundancia, (ii) la dificultad para asegurar un suministro regular y reproducible, (iii) la posible contaminación con patógenos no detectados, así como (iv) preocupaciones sociales y éticas. Se prefiere por lo tanto para su uso a escala industrial una fuente recombinante de lisozima humana. Se comparó la potencia tanto de lisozima derivada de leche materna humana natural como de lisozima humana recombinante derivada de arroz transgénico.

- La lisozima de leche materna humana natural purificada (L-6394; Sigma-Aldrich, Madrid, España) tuvo 101.000 unidades/mg de proteína y un contenido de lisozima del 10%. La lisozima de arroz transgénico humana recombinante purificada (159-53LZ-90P; Ventria Bioscience, Sacramento, California) tuvo 187.000 unidades/mg de proteína y un contenido de lisozima del 90%. La definición de unidad para ambas lisozimas es la siguiente. Una unidad produce un incremento de la absorbancia a 450 nm de 0,001 por minuto a pH 6,24 a 25 °C, usando una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato, en una mezcla de reacción de 2,6 ml (trayectoria de la luz de 1 cm) (Shugar *et al.* (1952) *Biochem. Biophys.* 8: 302-309). Para que los resultados del experimento sean comparables, se usó la proporción de 594 unidades de lisozima humana/µg de GST-Tp17 de cada uno. Se realizó una reacción de hemaglutinación, como se detalla en el Ejemplo 8, añadiendo una cantidad equivalente de la

lisozima natural o recombinante al reactivo de sífilis de hemaglutinación. La potencia de ambas lisozimas se ensayó contra muestras de sífilis positivas y negativas.

5 Como se ilustra en las Figuras 17A y 17B, 6 de las 10 muestras ensayadas mostraron una mejora en la sensibilidad del ensayo con la adición de lisozima humana natural (LysN) o recombinante (LysR).

10 La Figuras 18A ilustra que la adición de lisozima humana recombinante a un reactivo de sífilis de hemaglutinación mejoró sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En una evaluación de 34 muestras positivas reales, 14 de las 19 muestras que se ensayaron con resultado negativo usando el reactivo que no contenía lisozima, eran de hecho positivas cuando se añadió lisozima a la reacción. Como se ilustra en la Figura 18B, la diferenciación visual entre una reacción positiva y negativa se simplifica cuando se añade lisozima humana recombinante al reactivo.

15 La Figura 19 ilustra el rendimiento (intensidad de hemaglutinación relativa) de dos reactivos de hemaglutinación, con (reactivo LysR) o sin (reactivo R) lisozima humana recombinante (LysR). En ese experimento, el reactivo de hemaglutinación LysR rindió más que el reactivo R, presentando para todos los sueros ensayados ($\mu = 34$) un título de aglutinación relativo de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 veces mayor.

20 La Figura 20 ilustra que la adición de lisozima humana recombinante (LysR) a un reactivo de sífilis de hemaglutinación no proporciona resultados de falsos positivos. En una evaluación de 200 muestras de banco sanguíneo el resultado medio y la desviación típica entre ambos reactivos eran muy cercanos. La potencia de la lisozima humana recombinante es por lo tanto equivalente a la de lisozima de leche materna natural. La lisozima recombinante puede por lo tanto sustituir la lisozima natural para aplicaciones de diagnóstico.

25 **EJEMPLO 10: La lisozima humana mejora la sensibilidad de kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usados para diagnóstico de sífilis**

30 Se realiza rutinariamente exploración de sífilis usando kits de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA). Estos kits detectan la unión de anticuerpos anti-sífilis con antígenos de *T. pallidum* inmovilizados en los pocillos de una placa de microtitulación. Normalmente se lleva a cabo detección de la unión de anticuerpos anti-sífilis con la placa por medio de un antisuero marcado con enzima dirigido contra cadenas de anticuerpos Fc humanos (kit de segunda generación) o un antígeno de *T. pallidum* marcado con enzima (kit de tercera generación).

Se enumeran a continuación ejemplos de tales reactivos de diagnóstico disponibles en el mercado:

Nombre del producto	Fabricante	Formato del kit
Bioelisa Syphilis	Biokit S.A. (Lliça d'Amunt, España)	2ª generación
Bioelisa Syphilis 3.0	Biokit S.A. (Lliça d'Amunt, España)	3ª generación
ICE* Syphilis	Abbot Murex (Dartford, Reino Unido)	3ª generación
Syphilis EIA480	New Market Laboratories (Kentford, Reino Unido)	3ª generación
Enzywell	Diesse (Siena, Italia)	3ª generación

35 *Detección de anticuerpos de sífilis usando un formato de kit de segunda generación*

40 Todos los reactivos usados en este estudio se proporcionan por el kit de detección comercial Bioelisa Syphilis 3.0 (Biokit S.A., Lliça d'Amunt, España). El protocolo usado es el recomendado en el prospecto del kit. Brevemente, se añaden muestras de suero o plasma a los pocillos de una placa de microtitulación. Si están presentes anticuerpos específicos para *T. pallidum* en la muestra, estos forman complejos estables con los antígenos en el pocillo. Después de lavar para retirar el material no unido, se añade un conjugado de conejo anti IgG humano y anti IgM humano marcado con peroxidasa de rábano rústico y, si está presente el complejo antígeno/anticuerpo, el conjugado se une al complejo. Después de un segundo lavado, se añade una solución de sustrato de enzima que contiene un cromógeno. Esta solución desarrolla un color azul si la muestra es positiva. El color azul cambia a amarillo después de bloquear la reacción con ácido sulfúrico. La intensidad del color es proporcional a la concentración de anticuerpo anti-*T. pallidum* en la muestra. Los pocillos que contienen muestras negativas permanecen incoloros.

50 *Detección de anticuerpos de sífilis usando un formato de kit de tercera generación*

Todos los reactivos usados en este estudio se proporcionan por el kit de detección comercial Bioelisa Syphilis 3.0

(Biokit S.A., Lliça d'Amunt, España). El protocolo usado es el recomendado en el prospecto del kit. Brevemente, el ensayo se realiza incubando muestras de ensayo en los pocillos de una placa de microtitulación recubierta con proteínas de *T. pallidum* (por ejemplo, antígenos recombinantes Top15, Tp17 o Tp47). Los anticuerpos IgG e IgM específicos presentes en la muestra se unen a los antígenos de fase sólida. Posteriormente, los pocillos se lavan para retirar muestra de ensayo residual y se añaden antígenos de *T. pallidum* conjugados con la enzima peroxidasa. El conjugado se une a los anticuerpos específicos capturados. Después de otro lavado para eliminar material no unido, se añade una solución de sustrato enzimático y cromógeno. Esta solución desarrolla un color azul si la muestra contiene anticuerpos anti-*T. pallidum*. El color azul cambia a amarillo después de bloquear la reacción con ácido sulfúrico. La intensidad del color es proporcional a la concentración de anticuerpo anti-*T. pallidum* en la muestra.

Adición de lisozima humana recombinante

Para el formato de ELISA de segunda generación, se añadió lisozima humana recombinante (Ventria Bioscience, Ventura, CA) a 2,86 µg/ml a las placas de ELISA Bioelisa Syphilis 3.0. Para el kit de tercera generación, se añadió lisozima humana recombinante en el tampón de dilución de muestra a una concentración de 10,8 µg/ml, o en el tampón de dilución conjugado a una concentración de 1,08 µg/ml.

Como se representa en las Figuras 21A y 21B, cuando se ensayaron sueros humanos positivos para sífilis con los reactivos de ELISA Bioelisa Syphilis (segunda generación) y Bioelisa Syphilis 3.0 (tercera generación), se detectó un aumento significativo de la intensidad de señal en presencia de lisozima humana. El aumento de intensidad de señal estuvo en el intervalo de aproximadamente 20% cuando se añadió lisozima a la placa y los sueros se ensayaron en el formato de segunda generación, y en el intervalo de aproximadamente 200% (para 3 de 4 sueros) cuando se añadió lisozima tanto en el tampón de dilución de la muestra como en el tampón de dilución del conjugado y se procesaron de acuerdo con el formato de tercera generación. Resulta interesante que la adición de lisozima no modifica la respuesta de sueros humanos negativos para sífilis. Estos datos demuestran que la lisozima humana aumenta la sensibilidad de la detección y exploración de sífilis basada en ELISA.

EJEMPLO 11: Purificación del complejo de lisozima humana/Tp17

El complejo de lisozima humana/proteína Tp17 es altamente antigénico y, como se ha descrito anteriormente, es útil en ensayos de diagnóstico. El aislamiento del complejo lisozima humana/Tp17 purificado facilita el rendimiento de los estudios estructurales, tales como cristalización proteica y determinación de la estructura atómica mediante difracción por rayos X. Usando los procedimientos experimentales descritos posteriormente, se obtuvieron las cantidades en mg del complejo de lisozima humana/Tp17-HIS purificado.

Aislamiento del monómero Tp17-HIS y dímeros de Tp17-HIS

Se purificó adicionalmente la proteína Tp17-His purificada, obtenida como se describe en el ejemplo 1, mediante cromatografía de filtración en gel para separar monómeros y dímeros de otras formas agregadas (Figura 22). Se equilibró una columna HR 16/50 (1,6 cm de diámetro x 60 cm de altura; Amersham Biosciences, Cerdanyola, España) cargada con 100 ml de Superosa 12 HR con dos volúmenes de columna de tampón de filtración en gel (Tris 20 mM NaCl 300 mM, pH 8,0). Se inyectó después una muestra de 2 ml que contenía 8 mg de proteína de fusión Tp17-HIS y se realizó cromatografía a un caudal de 1-1,25 ml/minuto a una presión constante de 0,70 MPa. Se recogieron las fracciones (1,5 ml) correspondientes a monómeros de Tp17-HIS y dímeros de Tp17-HIS de tres ciclos cromatográficos consecutivos, y después se agruparon en una fracción monomérica de Tp17-HIS de 8 ml y una fracción dimerica de Tp17-HIS de 6 ml.

Formación del complejo de Tp17-HIS/lisozima humana in vitro

La lisozima humana recombinante (obtenida en el mercado de Ventria Bioscience, Sacramento, CA, Estados Unidos) consistía en proteínas monoméricas altamente homogéneas como se muestra en el resultado por ensayo representado en la Figura 23.

Para formar un complejo *in vitro*, se incubaron 3,8 mg de monómeros de Tp17-HIS purificados y dímeros de Tp17-HIS por separado durante 20 minutos a 22 °C sin agitación en presencia de un exceso molar 2 veces de lisozima humana recombinante purificada (Ventria Bioscience, Sacramento, CA, Estados Unidos).

Purificación del complejo de Tp17-HIS/lisozima humana por filtración en gel

Como se muestra en la Figura 24, los complejos de lisozima humana/Tp17 se separaron de monómeros no ensamblados por filtración en gel a través de gel de Superosa 12 HR 16/50 como se ha descrito anteriormente. Las fracciones correspondientes al pico de Tp17-HIS/lisozima humana se recogieron y se concentraron usando dispositivos Centricon Plus 20 (UFC2LGC08, The Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos) con un punto de corte de 10kDa. El tampón se intercambiaba durante la filtración con centrífuga lavando con tres volúmenes de

columna (10 ml) de Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0. Las muestras finales de Tp17-His_{monómeros}/lisozima humana y Tp17-His_{dímeros}/lisozima humana se recuperaron a 1,62 mg/ml y 1,57 mg/ml, respectivamente. El rendimiento de recuperación de proteína final fue del 60% para complejos Tp17-His_{monómeros}/lisozima humana y del 44% para complejos de Tp17-His_{dímeros}/lisozima humana.

EJEMPLO 12: Método para descubrir nuevas proteínas de tipo Tp17

Las proteínas Tp17 y de tipo Tp17 comparten la capacidad para unirse a lisozima humana. Basándose en esta observación, se concibió un método genérico que posibilita la detección de proteínas de tipo Tp17 en extractos proteicos totales de organismos patógenos. En una realización, la lisozima humana conjugada con un marcador detectable se hibrida con una muestra proteica. La unión de la lisozima identifica un polipéptido de tipo Tp17 en la muestra.

Preparación de un conjugado de lisozima humana-peroxidasa de rábano rústico (HuLYS-POD)

Se produjeron conjugados de lisozima humana-peroxidasa de rábano rústico mezclando 9,72 mg de lisozima humana recombinante (159-53LZ-90P; Ventria Bioscience, Sacramento, CA, Estados Unidos) y 13,6 mg de peroxidasa activada (POD) (1.428.861; Roche, Mannheim, Alemania) en un volumen total de 3,5 ml de tampón de carbonato (carbonato sódico/hidrogenocarbonato 50 mM, pH 9,55). La reacción de conjugación se llevó a cabo durante 2 horas a 25 °C en un baño de agua con agitación manual cada 30 minutos. La reacción se determinó mediante la adición sucesiva de 364 µl de trietanolamina 2 M (108379; Merck, Darmstadt, Alemania), y 455 µl de borohidruro sódico (45.288-2; Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania) a una concentración de 4 mg/ml en agua desionizada. La solución resultante se agitó manualmente durante 15 segundos y después se incubó durante 30 minutos a 2-8 °C. Después se añadieron 227 µl de trietanolamina 2 M y la mezcla se incubó durante 2 horas a 2-8 °C. A continuación, se añadieron 91 µl de glicina 1 M (104201; Merck, Darmstadt, Alemania) y la solución se dializó durante 15 horas contra tampón TSG (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, glicina 10 mM, pH 7,5). La solución se clarificó después por centrifugación durante 30 minutos a 15.000 g. Se recuperaron 4,5 ml de sobrenadante. Se añadieron 500 µl de BSA (Pentex Miles Inc., Kankakee, IL, Estados Unidos; 10% peso/volumen en tampón de TSG (Tris-HCl) y 25 µl de mertiolato - sulfato de gentamicina al conjugado. Se preparó sulfato de gentamicina-mertiolato disolviendo 25 mg de sulfato de gentamicina (22191 E1; Jescuder, Terrasa, España) y 400 mg de timerosal (T-5125 Sigma, Saint Louis, MO, Estados Unidos) en 8,0 ml de suero de ternero fetal. El pH se ajustó después a pH 8,0 con hidróxido sódico (5 M). Después el conjugado se esterilizó por filtración a través de un filtro Millex GV a de 0,22 µm (SLGV R04 NL; The Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos) y se almacenó protegido de la luz a 2-8 °C hasta su uso.

Procesamiento de la muestra proteica del patógeno

Se mezcló una muestra de 15 µl que contenía de 2 a 20 µg de proteína derivada de patógeno con 5 µl de tampón de carga NuPAGE® LDS (4X) (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y se separó inmediatamente en un gel de Bis-Tris poliacrilamida NuPAGE® Novex 4-12% (NPO323BOX; Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) usando tampón de ejecución de SDS NuPAGE® MES (1X) (NP0002; Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). La tensión aplicada es de 165 voltios constantes durante 35 minutos. Después de permitir que las proteínas migren, el gel se recupera y se incuba durante 15 minutos en tampón de electrotransferencia (tampón ET: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%, sin ajuste de pH). Las proteínas separadas en el gel se transfirieron después por electroforesis a una membrana IMMOBILON® P (IPVH00010; The Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos). La membrana se preparó aclarando una vez con metanol y dos veces con agua desionizada. Para realizar la transferencia electroforética, la tensión aplicada se mantuvo constante a 65 voltios durante 1 hora.

Ensayo de superposición de proteína HuLYS-POD

Después de la electrotransferencia, la membrana se incubó durante 1 hora a 22 °C en TBST (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween 20) complementado por 5% (peso/volumen) de leche desnatada SVELTESSE® (Nestlé España, Barcelona, España). La membrana se aclara a continuación con TBST y después se incubó durante 1 hora a 22 °C en TBST-leche que contiene el conjugado HuLYS-HRP, que se diluye 1/5.000. Después de la incubación la membrana se lava tres veces en TBST. Se consiguió después inmunotinción sumergiendo la membrana en 10 ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (T0565; SIGMA-ALDRICH Inc., Saint-Louis, MO, Estados Unidos) para visualizar las proteínas. Como un control positivo, se detecta una banda única que migra a 17 kDa y correspondiente a Ivy en un extracto celular de *Escherichia coli* BL21 (DE3).

EJEMPLO 13: Los patógenos bacterianos Gram-positivos secretan inhibidores de lisozima humana

Las bacterias Gram-positivas carecen de una membrana externa y presentan al medio de cultivo una capa de peptidoglicanos gruesa. Como consecuencia, estas bacterias probablemente sean más sensibles a muerte por lisozimas que las bacterias Gram-negativas. Por lo tanto, los inventores presentan la hipótesis de que las bacterias gram positivas que son patógenos humanos poseen inhibidores de lisozima. Debido a la ausencia de una membrana

externa, estos inhibidores pueden estar presentes en el medio de cultivo bacteriano. Como se describe posteriormente, los inventores ensayaron con respecto a la presencia de inhibidores de lisozima en el medio de cultivo de ocho especies bacterianas Gram-positivas clínicamente relevantes (*Enterococcus faecalis* cepa CECT184, *Enterococcus faecium* cepa ATCC 10541, *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 11632, *Staphylococcus epidermidis* cepa ATCC 12228, *Streptococcus pneumoniae* cepa ATCC49619, *Streptococcus pyogenes* cepa CECT598, *Streptococcus agalactiae* cepa CIP105451 y *Propionibacterium acnes* cepa RMN-GF).

Estas cepas se cultivaron durante 48 horas a 37 °C en caldo de Mueller-Hinton con cationes ajustados (CAMHB). Las células bacterianas se sedimentaron por centrifugación (20 minutos, 14.000 g, 4 °C) y se concentró 1 ml de sobrenadante a un volumen final de aproximadamente 200 µl usando dispositivos de filtro de centrifuga YM-10 Microcon® (The Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos). Se analizaron quince µl de cada concentrado de sobrenadante mediante electroforesis de SDS-PAGE usando un gel de gradiente 4-12% NuPAGE® y después se tiñeron con plata (kit SilverXpress®) para visualizar proteínas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (The Invitrogen company, Prat de Llobregat, Barcelona, España).

Como se muestra por el resultado de ensayo representado en la Figura 25, se detectaron distintos patrones proteicos para cada una de las ocho especies bacterianas ensayadas. La actividad bacteriolítica de la lisozima humana (1 unidad) se determinó en ausencia o en presencia de 10 µl del sobrenadante concentrado correspondiente a cada una de las ocho especies bacterianas. El ensayo se llevó a cabo como se ha descrito previamente, usando la lisozima EnzCheck® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos). Como se muestra en la Figura 26, se observó la inhibición completa de la actividad enzimática de lisozima en presencia de sobrenadantes concentrados de *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes*. Se observó inhibición parcial en presencia de sobrenadantes concentrados de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, y *Streptococcus pneumoniae*. No se detectó inhibición en sobrenadantes concentrados de *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus epidermidis* en estas condiciones de ensayo.

Estos datos demuestran que están presentes inhibidores no caracterizados de lisozima humana en bacterias Gram positivas clínicamente relevantes, que pueden ser una fuente potencial para descubrir tales inhibidores. Estos inhibidores representan nuevas y atractivas dianas para fármacos y vacunas, así como para nuevo ensayo de diagnóstico. Estos experimentos también indican que pueden usarse bacterias Gram positivas para explorar con respecto a polipéptidos de lisozima expresados en bacterias mutantes o naturales que son resistentes a la inhibición por polipéptido de tipo Tp17.

EJEMPLO 14: Métodos para identificar compuestos candidatos que inhiben la formación o estabilidad del complejo Tp17/lisozima

Se expresan proteínas Tp17 y de tipo Tp17 por numerosos patógenos humanos y animales (por ejemplo, virus, bacterias, hongos y protozoos). Los fármacos que interfieren con la formación y/o la estabilidad de complejos de proteína de tipo Tp17/HuLYS son compuestos candidatos antimicrobianos prometedores que pueden usarse para prevenir o tratar una infección por patógeno en un sujeto. Para aislar tales moléculas anti-microbianas, se ideó un ensayo de exploración *in vitro* como se describe posteriormente. Resultará evidente para un experto en la materia que este ensayo es útil para exploración de alto rendimiento de extractos biológicos y bibliotecas químicas. Como se muestra en la Figura 27, un método ejemplar implica las siguientes etapas:

Preparación de reactivos

Se preparó PBS 10X disolviendo 29 g de Na₂HPO₄/12 H₂O, 2 g de KH₂PO₄ y 80 g de NaCl en 1 litro de agua destilada apirógena y ajustando el pH a pH 6,8 con hidróxido sódico (10 M). Se preparó solución de BSA-Glicina disolviendo 10 g de BSA (81-003; Pentex Miles Inc., Kankakee, Estados Unidos), 7,5 g de glicina (500190, Merck, Darmstadt, Alemania) y 1 g de azida sódica (6688; Merck, Darmstadt, Alemania) en 1 litro de agua destilada (uso MilliQ, The Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos). El pH de la solución resultante fue pH 7,4 con NaOH (10 M). El tampón de lavado de ELISA 10X, sustrato cromogénico TMB y tampón de dilución de TMB están disponibles en el mercado (kit de 96 pocillos ANTI-HBS Bioelisa, 3000-1101; biokit SA, Lliça d'Amunt, España). Se obtuvo tampón de dilución de la muestra de ELISA de Bioelisa Syphilis 3.0 (3.000-1.148; biokit SA, Lliça d'Amunt, España).

Inmovilización de Tp17 y/o proteína de tipo Tp17 en un sustrato sólido

Se resuspendió proteína GST-Tp17 purificada, producida como se describe en el ejemplo 1, en PBS 1X a una concentración de 0,4 µg/ml y se distribuyeron 150 µl de esta solución en placas de microtitulación de 96 pocillos (MaxiSorp™ Lockwell™; NUNC, Roskilde, Dinamarca) y se incubaron durante 16 horas a temperatura ambiente (22 °C). A continuación, se añadieron 100 µl de solución de glicina-BSA y se incubaron durante 1 hora a 22 °C. Los pocillos se vaciaron después por aspiración y se cargaron inmediatamente con 200 µl de BSA-sacarosa. Se realizó incubación durante 1 hora 30 minutos a 22 °C. Los contenidos de líquido de cada pocillo se aspiraron

cuidadosamente y las placas se secaron después al aire durante 3 horas en una habitación seca (humedad relativa del 15%) antes de empaquetarse en bolsas de plástico herméticas.

Puesta en contacto de Tp17 y/o tipo Tp17 con compuesto o compuestos químicos y HuLYS-POD

Se añaden 100 µl de compuesto candidato (disuelto a una concentración que varía de 10 ng/ml a 10 mg/ml en tampón de dilución de muestra de ELISA) a un micropocillo y se incuba durante 15 minutos a 37 °C. Se añaden 50 µl de HuLYS-POD diluido 1/20.000 en tampón de dilución de muestra de ELISA al pocillo y se incuba durante un período adicional de 15 minutos. Los pocillos se lavan después cuatro veces con tampón de lavado.

Desarrollo del color y puntuación de compuestos candidatos

Se añaden después 100 µl de sustrato cromogénico de peroxidasa de rábano rústico (POD) diluido en tampón de dilución de sustrato a cada pocillo y se detiene el desarrollo del color después de 30 minutos después de la adición de 100 µl de H₂SO₄ 2 M. En este experimento la absorbancia media de tres pocillos incubados sin compuesto candidato se normaliza al valor del 100%. Las moléculas o extractos biológicos capaces de reducir la unión de HuLYS-POD por debajo de al menos el 40%, 50%, 60%, 75%, 85%, 95% o más se consideran candidatos de "acierto" como se demuestra por reducciones respectivas en el canal de señal en comparación con el valor normalizado. Preferentemente la unión se reduce por debajo del 85% en relación con pocillos de control no puestos en contacto con un compuesto candidato.

EJEMPLO 15: Tp17 inhibe preparaciones terapéuticas disponibles en el mercado de lisozima

La lisozima de pollo es una enzima antimicrobiana potente activa tanto contra bacterias como contra virus. Las preparaciones comerciales que contienen lisozima como un agente activo incluyen, pero sin limitación, LIZIPAINA® (Boehringer Ingelheim, San Cugat del Vallés, España) y LISOZIMA CHIESI (CHIESI ESPAÑA SA, Barcelona, España). Puesto que se demostró que la proteína Tp17 inhibe la actividad antibacteriana enzimática de lisozima de pollo purificada *in vitro*, los inventores postulan que Tp17 también puede inhibir la actividad antibacteriana de LIZIPAINA® y LISOZIMA CHIESI. Para ensayar esta hipótesis, se resuspendió un comprimido de cada fármaco, LIZIPAINA® (que contiene 5 mg de lisozima de pollo por comprimido) y LISOZIMA CHIESI (que contiene 250 mg de lisozima de pollo por comprimido), en agua desionizada (The Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos) para ajustar la concentración de lisozima a 4 µg/ml. Estas muestras se incubaron después en ausencia o en presencia de cantidades crecientes de GST-Tp17 o Tp17-HIS. En este experimento la relación molar entre lisozima de pollo y su inhibidor afín varió de 1:5 a 1:50 para GST-Tp17 y de 1:16 a 1:160 para Tp17-HIS. Después de un período de incubación de 5 minutos a 20 °C las muestras se ensayaron con respecto a la actividad enzimática de lisozima usando el kit de ensayo de lisozima EnzCheck® (E-22013, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, Estados Unidos) como se recomienda por las directrices del proveedor.

Como se presenta en la Figura 28A y 28B, tanto GST-Tp17 como Tp17-HIS inhibieron fuertemente la actividad antibacteriana enzimática de LIZIPAINA® y LISOZIMA CHIESI respectivamente. Por lo tanto, Tp17 y las proteínas de tipo Tp17 son capaces de inhibir la actividad antibacteriana enzimática de dos fármacos antimicrobianos disponibles en el mercado. Es probable que parte de la eficacia terapéutica proporcionada por LIZIPAINA®, LISOZIMA CHIESI, y fármacos relacionados se pierda *in vivo* debido a la inhibición de Tp17 y proteína de tipo Tp17. Como se ha analizado anteriormente, Tp17 y proteínas de tipo Tp17 se expresan ampliamente por patógenos bacterianos, virales, fúngicos y parasitarios humanos. En consecuencia, las variantes de lisozima que no están sometidas a inhibición enzimática por Tp17 y proteínas de tipo Tp17 son una clase prometedora de nuevos fármacos antimicrobianos.

EJEMPLO 16: La actividad antibacteriana de r-Lysozyme™ no está inhibida por Tp17

En la búsqueda de una variante de lisozima capaz de resistir la inhibición de Tp17 y proteínas de tipo Tp17, los inventores ensayaron la rLysozyme™ disponible en el mercado (71.110-5; Ncvagen® MerckKGaA, Darmstadt, Alemania). rLysozyme™ es una lisozima altamente purificada recombinante que se recomienda para lisis de células de *E. coli*. La enzima cataliza la hidrólisis de enlaces N-Acetilmuramida en la pared celular bacteriana. La actividad específica de solución de rLysozyme (1.700.000 U/mg) es 250 veces mayor que la de lisozima de clara de huevo de pollo y por lo tanto se requiere menos enzima para conseguir lisis de *E. coli*. Además, rLysozyme™ está óptimamente activa a un pH fisiológico (6,0 a 8,0) que es compatible con la línea de Novagen de reactivos de extracción de proteínas y ácidos nucleicos.

En ese contexto, los inventores compararon la actividad antibacteriana de lisozima humana (Ventria Bioscience, Sacramento, CA, Estados Unidos) y rLysozyme™ usando el ensayo de lisozima EnzCheck (E-22013, Molecular Probes, Eugene, Oregón). Los inventores determinaron en primer lugar que en las condiciones de ensayo prescritas por el fabricante, 1 unidad de lisozima humana producía la misma intensidad de fluorescencia que 230 unidades de rLysozyme™. A continuación, los inventores midieron la intensidad de fluorescencia de 1 unidad de lisozima humana o 230 unidades de rLysozyme™, en presencia o ausencia de 10 µg de GST-Tp17 o Tp17-HIS. Como se muestra en

la Figura 29, rLysozyme™ no era susceptible a la inhibición de GST-Tp17 o Tp17-HIS, mientras que la actividad antibacteriana de la lisozima humana estaba fuertemente inhibida. Resulta interesante que los inventores observaron de forma reproducible un ligero aumento (en el intervalo del 20%) de la actividad antibacteriana de rLysozyme™ en presencia de Tp17. Tomados juntos, estos resultados sugieren que rLysozyme™ no es susceptible de inhibición por Tp17 y posiblemente proteínas de tipo Tp17. En consecuencia, rLysozyme™ representa un nuevo y prometedor fármaco antimicrobiano que podría con el tiempo sustituir la lisozima de pollo en diversas preparaciones terapéuticas pretendidas para uso humano y animal. Adicionalmente, puede usarse como un antiséptico y/o como un conservante alimentario.

10 **EJEMPLO 17: La proteína precursora de Alzheimer (β APP) comparte similitud estructural con proteínas de tipo Tp17.**

Entre las proteínas que comparten una extensiva similitud de secuencia con Tp17 (véase, por ejemplo, Figura 1), los inventores identificaron la proteína precursora Beta Amiloide humana (β -APP). Esta proteína es de interés médico y diagnóstico clave puesto que está implicada en la generación de la deposición de amiloides durante la enfermedad de Alzheimer. Como se muestra en la Figura 30, los inventores han descubierto un motivo peptídico bien conservado que se comparte por miembros de la familia de la proteína Ivy, Tp17, y las tres isoformas de corte y empalme de β -APP (APP770, APP751 y APP695). Alineamientos múltiples realizados a mano permitieron a los inventores agrupar todas estas secuencias peptídicas bajo el siguiente consenso:

20 CX (1,5) [KRH] [AG] [KRH] X (0,2) [KR] X (0,1) [EDQN] C (SEC ID N°: 178)

En este consenso, C, K, R, H, A, G, E, D, Q y N corresponden al código de aminoácidos de una letra para cisteína, lisina, arginina, histidina, alanina, glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina y asparagina, respectivamente. Las reglas de sintaxis son las usadas en la base de datos de PROSITE. Este consenso también puede representarse como sigue:

25 Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Cys (SEC ID N°: 177)

30 en la que Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄ y Xaa₅ son cualquier aminoácido o están ausentes, Xaa₆ es el aminoácido K, R o H, Xaa₇ es A o G, Xaa₈ es K, R o H, Xaa₉ y Xaa₁₀ son cualquier aminoácidos o están ausentes, Xaa₁₁ es el aminoácido K o R, Xaa₁₂ es cualquier aminoácido o está ausente y Xaa₁₃ es el aminoácido E, D, Q o N.

35 Para tres de estas proteínas (Ivy de *E. coli*, Tp17 y *P. aeruginosa*), estaban disponibles estructuras cristalinas. Usando el visor molecular Cn3D, los inventores descubrieron que los tramos peptídicos relacionados de cada una de las tres proteínas mostraban una organización tridimensional conservada. Como se muestra en la Figura 31, los tres forman una lámina beta extendida, que presenta un bucle peptídico con enlace disulfuro. Estas proteínas comparten una organización estructural tridimensional conservada. Las tres moléculas contienen una estructura en lámina beta extendida y un bucle peptídico con enlace disulfuro expuesto. Este motivo estructural se conserva en las tres isoformas (APP770, APP751 y APP695) de la proteína β -APP humana. Las vistas en 3D se generaron usando software Cn3D, que está disponible en el sitio web del Centro Nacional para la Biotecnología y los siguientes archivos de coordenadas atómicas del Banco de Datos de Proteínas (PDB) 1GPQ (*E. coli* Ivy), 1UUZ (*P. aeruginosa* Ivy) y 1MWp (*Homo sapiens* β -APP). Estos datos sugieren que Ivy, Tp17 y β -APP están estructuralmente y funcionalmente relacionadas.

45 **EJEMPLO 18: La lisozima humana se une a la proteína precursora de Alzheimer inmovilizada (β APP).**

Como se muestra en la Figura 32, el sitio de unión a lisozima identificado en β -APP queda en el extremo N terminal de la proteína y abarca los restos 92 a 116. La isoforma APP751 (de 751 aminoácidos de longitud) es un polipéptido de tipo APP ejemplar. Las conclusiones extraídas de esta figura también son ciertas para las isoformas APP695 y APP770. Los números de aminoácidos se refieren a posiciones de aminoácidos en la secuencia de β -APP depositada con el número de referencia de Genbank NP_958816. El sitio de unión a lisozima se localiza entre los restos 92 a 116. Específicamente, los inventores usaron un fragmento más largo de derivado de β -APP, denominado sAPP α y un fragmento más corto denominado sAPP α (304-612). Tanto sAPP α como sAPP α (304-612) derivan de la isoforma APP695 y en consecuencia carecen del dominio inhibidor de proteasa kunitz (restos 289 a 342 en APP770 y APP751).

60 Para ensayar si la proteína β -APP se une a huLYS, los inventores realizaron ensayos de unión a lisozima usando formas recombinantes purificadas de β -APP. Tanto sAPP α (número de producto: S9564) como sAPP α (302-612) (número de producto: S8065) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Tres Cantos, Madrid, España). Se aplicaron puntualmente 10 μ g de cada proteína en una membrana Nytran (Scliecher & Schuell, Dassel, Alemania). Se bloquearon los sitios de adsorción no específica por incubación durante una hora en TBST-leche. Después de tres lavados con TBST, la membrana se incubó durante una hora con lisozima humana marcada con peroxidasa de rábano rusticano (POD) diluida 1/1000 en TBST-leche. A continuación, la membrana se lavó tres veces, durante 5 minutos cada lavado, con TBST. Se realizó tinción añadiendo 5 ml de sustrato cromogénico de POD (TMB, número

de producto: T0565, Sigma). Como se muestra en la Figura 33, huLYS se unió a sAPP α , pero no a APP α (302-612). Esta observación sugirió que la proteína β -APP se une a huLYS, y que el sitio de unión se localiza en la región N terminal, entre los restos 92 y 116 de β -APP. Estos datos definen una nueva diana farmacológica para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer. Además, el complejo de proteína huLYS/ β -APP probablemente actúa como un marcador de diagnóstico de enfermedad de Alzheimer.

Las composiciones y métodos de diagnóstico relacionados con la enfermedad de Alzheimer presentan fragmentos de un polipéptido de tipo APP sustancialmente puro que comprende una secuencia de aminoácidos de Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Cys (SEC ID N°: 177), en la que Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄ y Xaa₅ son cualquier aminoácido o están ausentes, Xaa₆ es el aminoácido K, R o H, Xaa₇ es A o G, Xaa₈ es K, R o H, Xaa₉ y Xaa₁₀ son cualquier aminoácido o están ausentes, Xaa₁₁ es el aminoácido K o R, Xaa₁₂ es cualquier aminoácido o está ausente, y Xaa₁₃ es el aminoácido E, D, Q o N. Las composiciones y métodos también presentan como moléculas de ácido nucleico que codifican estos fragmentos polipeptídicos, vectores para la expresión de tales fragmentos, y células hospedadoras que contienen estos vectores. Tales fragmentos pueden expresarse como polipéptidos recombinantes y usarse para la generación de anticuerpos que reconozcan el fragmento o que reconozcan el fragmento cuando forman complejo con un polipéptido de lisozima.

Los anticuerpos que se unen específicamente a un complejo de polipéptido de tipo APP/lisozima son útiles en métodos para diagnosticar enfermedad de Alzheimer en un sujeto, en los que el anticuerpo se usa para explorar una muestra biológica del sujeto, tal como una muestra de suero, una muestra de líquido cefalorraquídeo o una muestra tisular. En la actualidad, un diagnóstico definitivo de enfermedad de Alzheimer generalmente requiere una examinación post-mortem del tejido cerebral de un sujeto. Por lo tanto, las presentes composiciones y métodos, que facilitan el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en fluidos corporales obtenidos de un sujeto vivo, proporcionan una mejora significativa frente a métodos de diagnóstico existentes.

Específicamente, la presente invención proporciona un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer detectando la presencia en una muestra del sujeto de un complejo entre un polipéptido de tipo APP y un polipéptido de lisozima, o la presencia de un anticuerpo que se une a dicho complejo. Además, se proporciona un método para identificar un compuesto candidato que modula la unión entre el polipéptido de tipo APP y un polipéptido de lisozima a través de la detección de una reducción en la unión entre el polipéptido de tipo Tp17 y el polipéptido de lisozima en presencia del compuesto candidato

EJEMPLO 19: Identificación por ordenador de nuevas proteínas de tipo Tp17

Se buscaron en bases de datos de secuencia peptídica (SwissProt y TrEMBL) proteínas que compartan la secuencia consenso CX (1,5) [KRH] [AG] [KRH] X (0,2) [KR] X (0,1) [EDQN] C (SEC ID N°: 178) definida en la Figura 30. Las proteínas bacterianas, virales y eucariotas que se ha identificado que tienen esta secuencia se muestran en las Figuras 34A y 34B. Estas proteínas representan nuevas dianas terapéuticas y composiciones inmunogénicas que probablemente interfieran con la formación de complejos de proteína huLYS/tipo Tp17. Además, estas proteínas, en complejo con huLYS, pueden representar marcadores atractivos para el diagnóstico de enfermedades humanas, animales y vegetales.

EJEMPLO 20: Inhibición y capacidad de unión de mutantes de Tp17

Para determinar si H₃₁ e His₁₀₄ de Tp17 contribuían a la inhibición de huLYS, los inventores realizaron mutagénesis dirigida del gen que codifica GST-Tp17 (Figura 35A). Los polipéptidos mutantes de GST-Tp17 H₃₁A y His₁₀₄A se generaron introduciendo dos cambios de nucleótidos en el vector plasmídico pGEX2T-Tp17 usando el kit de mutagénesis dirigida QuickChange® (Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos). Para ese fin, se hibridaron por separado los oligonucleótidos mutagénicos Fw_CPAAG (5'-CCG TGT GTC CGG CCG CCG GGA AGG C-3') (SEC ID N°: 298) y Bw_CPAAG (5'-GCC TTC GCG CCG GCC GGA CAC ACG G-3') (SEC ID N°: 299) y los oligonucleótidos Fw_KPAE (5'-AAT CGA AGG CAC CGG CCG AGA AAG AGC TGT ACG-3') (SEC ID N°: 300) y Bw_KPAE (5'-CGT ACA GCT CTT TCT CGG CCG GTG CCT TCG ATT-3') (SEC. ID N°: 301) con pGEX2T-Tp17 desnaturalizado, y se extendieron usando ADN polimerasa *Pfu Turbo* en condiciones recomendadas por el proveedor. Se eliminó el molde de ADFN no metilado por digestión con DpnI y la mezcla de digestión resultante se usó para transformar células supercompetentes XL-1 Blue®. Se seleccionaron plásmidos mutantes por mapeo de restricción de los amplicones de PCR resultantes. La presencia de la mutación H₃₁A se confirmó secuenciando el gen de Tp17 mutado de longitud completa. Después se produjo GST-Tp17 mutante que portaba la mutación H₃₁A o la His₁₀₄A y se purificó como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se realizaron ensayos de inhibición de lisozima como se describe posteriormente.

Cada mezcla de reacción de 100 μ l contenía 25 μ l de solución de lisozima (2 unidades para lisozima humana, disueltas en tampón de reacción), 25 μ l de una solución de proteína de ensayo, y 50 μ l de una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* marcado con fluoresceína (50 μ g/ml). La mezcla de reacción se incubó después durante 45 minutos a 37 °C. Se midió la fluorescencia presente en la mezcla de reacción ($\lambda_{exc.}$ = 485 nm; λ_{emi} = 520 nm) usando un modelo de lector de placas multipocillo de fluorescencia FLx800 (Bio Tek Instruments, Winoosky,

Vermont) equipado con software de adquisición de datos KC junior (Bio TEK Instruments, Winoosky, Vermont). Los datos fluorescentes resultantes, mostrados en la Figura 35B, representan la media y desviación típica correspondientes a la lectura de tres pocillos independientes. Un pocillo de control negativo contenía 50 μ l de agua desionizada y 50 μ l de suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* marcado con fluoresceína.

Como se muestra en las Figuras 35A y 35B, los polipéptidos mutantes H₃₁A e His₁₀₄A mostraron una reducción de la inhibición de lisozima, pero conservaron su capacidad para unirse a lisozima (Figura 36). Estos datos demostraron que las posiciones de aminoácidos 31 y 104 contribuyen a la unión y/o inhibición de lisozima. Por lo tanto, las realizaciones de un Tp17 mutante de acuerdo con la presente invención incluyen una o más mutaciones en y/o alrededor de H₃₁ e His₁₀₄ de Tp17 y sitios correspondientes en otros patógenos de tipo Tp17. Dicho mutante puede interferir con inhibición normal de una proteína de tipo Tp17 *in vivo* y tener por lo tanto efectos terapéuticos descritos anteriormente.

EJEMPLO 21: Tp17 puede unirse a la proteína de tipo lisozima SLLP1

Una proteína de tipo lisozima única, no bacteriolítica, de pollo o de tipo convencional (tipo C), SLLP1, está presente en el acrosoma del espermatozoide humano (Mandal *et al.* Biol. Reprod. 68:1525-37, 2003). Normalmente, las lisozimas de tipo C son bacteriolíticas y pueden unirse a N-acetilglucosaminas ligadas por enlaces glicosídicos beta-1,4. La mayoría de los restos invariantes (17 de 20), incluyendo todas las cisteínas, se conservan en SLLP1, pero los dos restos catalíticos E35 y D52 conservados en lisozimas C se han reemplazado en SLLP1 con T y N, respectivamente, para convertirse en T122 y N139. Mandal *et al.* presentaron la hipótesis de que, después de la reacción del acrosoma, SLLP1 podría ser un receptor potencial para el resto oligosacárido de huevo N-acetilglucosamina, que está presente en la matriz extracelular sobre la membrana plasmática de huevo, dentro del espacio perivitelino, poros de la zona pelúcida y capas del cúmulus.

Los inventores han descubierto que huLYS, chkLYS y SLLP1 comparten más del 55% de identidad de secuencia. Como se muestra en la Figura 37, aunque la lisozima humana y lisozima de pollo comparten el 63% de la identidad de secuencia de aminoácidos, SLLP1 y la lisozima humana comparten el 58% de la identidad de secuencia. Puesto que Tp17 es capaz de unirse tanto a huLYS como a chkLYS, y basándose en el alto nivel de identidad de secuencia presente entre estas proteínas, es probable que los polipéptidos de tipo Tp17 incluyendo Tp17 también sean capaces de unirse a SLLP1. Esta interacción puede facilitar la transmisión de patógenos durante el contacto sexual. Como se muestra en la Figura 38, un complejo de polipéptido de tipo Tp17/SLLP1 representa una diana terapéutica prometedora para el control de fertilidad humana y animal. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 38, la administración de una cantidad eficaz de un polipéptido de tipo Tp17 puede actuar como un método de anticoncepción ya que interfiere con el acoplamiento normal de un espermatozoide con un receptor afín en una superficie del oocito.

Además, los compuestos candidatos que reducen la unión de un polipéptido de tipo Tp17 con SLLP1 son inhibidores útiles de enfermedad de transmisión sexual. Se han descrito anteriormente métodos para explorar dichos compuestos.

Además, aunque SLLP1 natural no es probablemente bacteriolítica, SLLP1 mutante, que contiene alteraciones de aminoácidos de T122 a E y/o de N139 a D, especialmente el doble mutante que contiene ambas mutaciones de vuelta a la secuencia conservada de lisozima de tipo C, probablemente adquiera actividad bacteriolítica. La SLLP1 mutante que contiene estas mutaciones probablemente no se una a polipéptidos de tipo Tp17 y probablemente tenga actividad enzimática de lisozima aumentada en relación con lisozima de pollo, por ejemplo. Como tal, la SLLP1 mutante puede usarse por su capacidad antimicrobiana, por ejemplo, bacteriolítica, potenciada como una composición farmacéutica o desinfectante. Otra variante de lisozima tal como la lisozima del bacteriófago T4, también puede usarse de un modo similar. Una realización de dicha composición puede incluir entre aproximadamente 2 y 100 mg de la variante de lisozima (preferentemente aproximadamente 5 mg), aproximadamente 2 mg de papaína y/o aproximadamente 3 mg de bacitracina. Una realización preferida se puede disolver para consumo oral.

Otras realizaciones

La invención puede realizarse de diversas formas específicas sin alejarse del alcance de las reivindicaciones. Puede combinarse cualquier aspecto y característica de la invención anteriormente descrita. Las realizaciones anteriores deben por lo tanto considerarse en todos los aspectos ilustrativas en lugar de limitantes de la invención descrita en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un anticuerpo anti-patógeno en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:
 - 5 (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con una lisozima exógena y un polipéptido de tipo Tp17, en el que el polipéptido de tipo Tp17: (i) comprende la secuencia consenso de unión a lisozima Xaa_n Pro His Xaa_n; y (ii) se une a la lisozima para formar un complejo de polipéptido de tipo Tp17-lisozima que se une a dicho anticuerpo anti-patógeno; y
 - 10 (b) detectar unión de anticuerpo anti-patógeno con el complejo de polipéptido de tipo Tp17-lisozima.
2. El método de la reivindicación 1 en el que el motivo se selecciona de las siguientes secuencias CCPHAG, VCPHAG, VAPHDC, KAPHDK, VKPHDG, KKPHAK, KAPHEK, KKPHAC, VAPHAG, VKPHAK, VKPHAC, VAPHEG, VKPHEK, VCPHEK, CKPHAG, ACPHAG, KCPHDC, VKPHDK, KKPHAG y CAPHEK.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 en el que el polipéptido de tipo Tp17 comprende la secuencia consenso CS3: Xaa Cys Pro His Ala Gly, en la que Xaa es Cys o Val.
4. Un método para potenciar la sensibilidad de un ensayo de diagnóstico para detectar en una muestra biológica una respuesta inmune contra un patógeno, comprendiendo el método añadir un polipéptido de lisozima exógena al ensayo de diagnóstico por lo que el polipéptido de lisozima se pone en contacto con un polipéptido de tipo Tp17 antes de, durante, o después de poner en contacto la muestra biológica con el polipéptido de tipo Tp17, en el que el polipéptido de tipo Tp17 se une a un polipéptido de lisozima y comprende la secuencia consenso del motivo de unión a lisozima Xaa_n Pro His Xaa_n y la adición del polipéptido de lisozima aumenta la sensibilidad del ensayo en al menos el 5%.
 - 20
 - 25
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ensayo de diagnóstico es un ensayo de aglutinación.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el polipéptido de tipo Tp17 o el polipéptido de lisozima está fusionado con un marcador de afinidad.
 - 30
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el polipéptido de tipo Tp17 o el polipéptido de lisozima está fijado a un soporte sólido.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el ensayo comprende un inmunoensayo.
 - 35
9. El método de la reivindicación 8 en el que el inmunoensayo se selecciona del grupo que consiste en ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), transferencia de western, ensayo de inmunoaglutinación, radioinmunoensayo, ensayo turbidimétrico, ensayo nefelométrico, ensayo inmunocromatográfico, ensayo quimioluminiscente y ensayo fluorescente.
 - 40
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el polipéptido de lisozima se pone en contacto con el polipéptido de tipo Tp17 antes de, durante o después de poner en contacto la muestra biológica.
 - 45
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el polipéptido o los polipéptidos de tipo Tp17 son recombinantes.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el polipéptido de lisozima es recombinante.
 - 50
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el polipéptido de lisozima deriva de ser humano.
 - 55
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el patógeno se selecciona del grupo que consiste en una bacteria, un virus, un parásito, un plásmido, un prion, un micoplasma y un agente micótico.
 - 60
15. El método de la reivindicación 14, en el que el patógeno es *Treponema pallidum*.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, lágrimas, saliva, esputo, líquido nasal, líquido ótico, líquido genital, líquido mamario, leche, calostro, líquido placentario, sudoración, líquido sinovial, líquido ascítico,

- líquido gastrointestinal, exudado, trasudado, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, bilis, fluido gástrico, semen, materia fecal, líquido de las vías respiratorias superiores, líquido peritoneal, líquido recogido de un sitio de inflamación, líquido recogido de un sitio de recogida agrupado, lavado bronquial, orina, material de biopsia, humor acuoso, material del rumen de un animal rumiante, muestra de células nucleadas, cualquier fluido asociado con una superficie mucosa, pelo y piel.
- 5 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes usándose el método para diagnosticar sífilis.
- 10 18. Un kit adecuado para su uso en el método de la reivindicación 1 o reivindicación 4, comprendiendo dicho kit un polipéptido de tipo Tp17 y un polipéptido de lisozima sustancialmente pura exógena, en el que el polipéptido de tipo Tp17 se une al polipéptido de lisozima y comprende la secuencia consenso del motivo de unión a lisozima Xaa_n Pro His Xaa_n.
- 15 19. El kit de la reivindicación 19, en el que el polipéptido de tipo Tp17 o el polipéptido de lisozima está unido a un soporte sólido.
- 20 20. El kit de la reivindicación 19, en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en una resina, un gel, una perla, un pocillo, una columna, una microplaca, una membrana, una matriz, una placa y un dispositivo de filtro.
- 25 21. Una composición adecuada para uso en el método de la reivindicación 1 o reivindicación 4 que comprende un polipéptido de tipo Tp17 sustancialmente puro y un polipéptido de lisozima exógena sustancialmente puro, en la que el polipéptido de tipo Tp17 es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 siempre que el motivo no sea CKPHDC.
- 30 22. La composición de la reivindicación 21, en la que el polipéptido de lisozima y el polipéptido de tipo Tp17 están presentes en una relación molecular de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1.000.000.
- 35 23. La composición de la reivindicación 21, que comprende además partículas vehículo.
24. La composición de la reivindicación 21 en la que las partículas vehículo se seleccionan del grupo que consiste en glóbulos rojos, partículas agregadas polipeptídicas, partículas poliméricas, partículas inorgánicas, partículas paramagnéticas y células de levadura.
- 40 25. La composición de la reivindicación 21, en la que el polipéptido de tipo Tp17 deriva de un patógeno seleccionado del grupo que consiste en una bacteria, un virus, un parásito, un plásmido, un prion, un micoplasma y un agente micótico.
- 45 26. La composición de la reivindicación 21, en la que el polipéptido de tipo Tp17 deriva de *Treponema pallidum*.
- 50 27. La composición de la reivindicación 21, en la que el polipéptido de tipo Tp17 se aísla de una muestra biológica.
28. La composición de la reivindicación 21, en la que el polipéptido de tipo Tp17 es un polipéptido recombinante.
29. La composición de la reivindicación 21, en la que el polipéptido de tipo Tp17 está fusionado con un marcador de afinidad.
- 55 30. La composición de la reivindicación 21, en la que el polipéptido de tipo Tp17 está marcado de forma detectable.
31. La composición de la reivindicación 21, en la que el polipéptido de tipo Tp17 y/o el polipéptido de lisozima está fijado a un soporte sólido.
32. El kit de la reivindicación 18, 19 o 20 o la composición de la reivindicación 21, en el que el polipéptido de lisozima comprende una secuencia derivada de un polipéptido de lisozima humana.
- 60 33. El método de la reivindicación 1, kit de la reivindicación 18 o composición de la reivindicación 21 en el que el polipéptido de tipo Tp17 es un polipéptido de tipo Tp17 maduro.

Figura 1A

TrEMBL	DESCRIPCIÓN	HOSPEDADOR	SECUENCIA PEPTIDICA	LOCALIZACIÓN	SEC ID Nº:
Número de referencia				(aa)	
P45502	Inhibidor de lisozima IVY	<i>E.coli</i>	Ck...PH.....DC	85 a 90	-24
Q9HXB1	Inhibidor de lisozima de tipo IVY	<i>P.aeruginosa</i>	Ck...PH.....DC	83 a 88	-24
P58483	Inhibidor de lisozima de tipo IVY	<i>Y.pestis</i>	Ck...PH.....DC	85 a 90	-24
Q83M91	Inhibidor de lisozima de tipo IVY	<i>S.flexneri</i>	Ck...PH.....DC	85 a 90	-24
Q9E147	Neuroaminidasa	Virus de gripe A	Cg...PH.....EC	124 a 129	-44
Q97273	Proteína no caracterizada	<i>P.falciparum</i>	C...PHn.....DC	96 a 101	-45
EAA39977	Proteína no caracterizada	<i>G.lambli</i>	C...PHg.....EC	66 a 71	-46
Q87LP5	Proteína de tipo TrmA	<i>V.parahaemolyticus</i>	C...PHyh.....EC	82 a 88	-47
Q914C2	Proteína no caracterizada	<i>P.aeruginosa</i>	C...PHlr.....DC	173 a 179	-48
Q9CMU6	Proteína Dnt	<i>P.multocida</i>	C...PHyn.....DC	184 a 190	-49
Q8YIK0	Metiltransferasa	<i>B.melitensis</i>	C...PHgl.....DC	215 a 221	-50
Q8FZB6	Proteína no caracterizada	<i>B.Suls</i>	C...PHgl.....DC	215 a 221	-50
Q506B2	Proteína no caracterizada	<i>M.tuberculosis</i>	C...PHav.....DC	5 a 12	-51
Q8B957	Eritrocito varPAM1	<i>P.falciparum</i>	C...PHckv.....DC	280 a 287	-52
Q8B3E6	Antígeno P1EMP1	<i>P.falciparum</i>	C...PHcev.....DC	474 a 481	-53
Q9PNE3	Fosfatasa potencial	<i>C.jejuni</i>	C...PHegc.....EC	90 a 96	-54
Q83R05	HlsB	<i>S.flexneri</i>	C...PHlpad.....EC	93 a 102	-55
Q917C0	Proteína no caracterizada	<i>P.aeruginosa</i>	C...PHgppddg.....DC	91 a 101	-56
Q88RS0	Hidrolasa	<i>P.putida</i>	C...PHgppdeg.....DC	89 a 99	-57
Q7VFZ1	Proteína no caracterizada	<i>H.hepaticus</i>	C...PHlpsenc.....DC	90 a 100	-58
P16823	Proteína UL71	<i>HCMV</i>	Cj...PHtrpaa.....EC	93 a 105	-59
Q7X5H2	Proteína no caracterizada	<i>P.aeruginosa</i>	C...PHrlaeiq.....EC	205 a 216	-60
Q91TM5	Proteína U44	<i>Tupala herpesvirus</i>	C...PHmrpaaev.....EC	105 a 117	-61
Q8Q5Z8	Proteína de Tegumento UL71	<i>CMV de chimpancé</i>	Cj...PHtrpaaov.....EC	93 a 105	-62
P36778	Proteína reguladora E2	<i>HPV3</i>	C...PHplghrsdp.....DC	289 a 301	-63
P27915	Poliproteína	Virus Dengue 3	C...PHltevepedl.....DC	167 a 180	-64
P29722	Antígeno Tp17	<i>T.pallidum</i>	C...PHagkkaekv.....EC	29 a 42	-65
Q8B5V5	Proteína VP1	Virus FMDV	ta...PHrciatlyng.....DC	27 a 41	-66
Q8Q6W1	Integrasa	<i>VH-1</i>	C...Pevgqm.....DC	56 a 65	-67
P05067	Proteína beta amiloide A4	Humano	CkthPHfvlpvyr.....-C	105 a 117	-68
P51693	Proteína de tipo amiloide	Humano	CahPHhqvvpvfr.....-C	128 a 140	-69
Q9UKF5	Proteasa ADAM 29	Humano	Ct...PHrs.....-C	307 a 313	-70
P01730	Glicoproteína CD4 de linfocitos T	Humano	CgcPHrfqkt.....-C	445 a 455	-71
P36706	Tipo adenovirus 12	Virus humano	CrqPHcfardl.....-C	17 a 28	-72
P19558	Env viral	Virus bovino	Ck...PHgry.....-C	615 a 622	-73
P03437	Hemaglutinina gripe A	Virus humano	CnnPHrildgl.....-DC	68 a 80	-74
Q9H293	Interleucina-17E	Humano	ClcPH.....-C	110 a 115	-75
Q07568	IpgF	<i>Shigella</i>	CflPHlgrad.....-C	10 a 20	-76
P59868	Imperatoxina IpTxA	Escorpión	CiPHlkrckadn.....DC	3 a 17	-77
P78395	Antígeno de melanoma (OIP4)	Humano	C...PH.....-C	487 a 490	-78
P04637	Antígeno tumoral celular P53	Humano	C...PHher.....-C	176 a 182	-79
Q65900	Proteína de cubierta VP4	Virus Coxsackie	C...PHgwlnlfrtnn.....C	247 a 259	-80
P27915	Proteína de capsida C	Virus Dengue	C...PHitovepedl.....DC	167 a 180	-81
P27960	Proteína de capsida C	Virus de hepatitis C	C...PHrlav.....-C	452 a 459	-82
P13888	Poliproteína no estructural	Virus de rubeola	Cg...PHyann.....-C	1446 a 1454	-83
P08768	Poliproteína estructural	Virus EEE	CtakPHpdyq.....-C	865 a 876	-84
P15358	Inhibidor de coagulación antiestatina	Sanguiuuela	C...PHglqreryg.....-C	54 a 65	-85
P17690	Beta-2-glicoproteína I (ApoH)	Bovino	CflPHhamfgndvt.....C	174 a 188	-86
P03148	Antígeno central	Virus de hepatitis B	Ca...PHhteirgail.....C	48 a 61	-87
P31627	Poliproteína Env	Virus CAE	CslPHkneankwt.....-C	528 a 541	-88
P11268	Poliproteína Env	Lentivirus Visna	CpgPHrprwars.....-C	152 a 164	-89
		Consenso	CXXXPHXXXXXX		

ORGANISMO	NÚMERO DE REFERENCIA	SECUENCIA	LOCALIZACIÓN	SEC ID N°:
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Q7VL21	CDHYFEGQGEYQOKC--DC	91 - 107	179
<i>Haemophilus influenzae</i>	P46452	CDHHSEGKGEYKE---DC	89 - 103	180
<i>Salmonella typhi</i>	Q8Z989	CPHHPQGSIEEFRQVDC	92 - 109	181
<i>Vibrio cholerae</i>	Q9KTJ4	CPHHAEHGIGQYKECDC	89 - 105	182
<i>Vibrio vulnificus</i>	Q7MN24	CPHHAEHGIVGDKYQ--DC	129 - 144	183
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Q7MU89	CPHHGNTNQKSS----DC	7 - 20	184
<i>Helicobacter pylori</i>	O25531	CPHAPPE-----NC	92 - 100	185
<i>Neisseria meningitidis</i> A	Q9JXI5	CPHTDAD-----NC	89 - 97	186
<i>Neisseria meningitidis</i> B	Q9JWE9	CPHTDAD-----NC	89 - 97	187
<i>Coxiella burnetti</i>	Q83AA9	CPHAPQA-----NC	93 - 101	188
<i>Bordetella pertussis</i>	Q7WUQ4	CPHGPDDG-----C	89 - 97	189
<i>Treponema denticola</i>	Q73JB5	CPHCGRFFASVR-----C	28 - 40	190
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Q89Z72	CPHSGKRMLLNLL---C	77 - 91	191
<i>Legionella pneumophila</i>	CAH12563	CPHYQM-----C	77 - 88	192
<i>Staphylococcus aureus</i>	NP_646083	CPHADGRRVI-----C	63 - 74	193
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ORF1557	CPHPRPRRRQGR-----C	86 - 99	194

FIG.1B

ORGANISMO	CLASE	HOSPEDADOR	SECUENCIA PEPTIDICA	NOMBRE PROTEINA	LOCALIZACION AMINOACIDO	NUMERO DE REFERENCIA DE Swise-Prot-TREMBL
GRAMPOSITIVOS						
<i>Escherichia coli</i>	Bacteria	Humano	P H	Ivy	85-80	P45502
<i>Yersinia pestis</i>	Bacteria	Humano	P H	Y557	85-80	P58483
<i>Yersinia pestis</i>	Bacteria	Humano	P H	Racemasa	322-327	Q8ZFW9
<i>Yersinia pestis</i>	Bacteria	Humano	P H	Hypot	347-352	Q8CKY8
<i>Shigella flexneri</i>	Bacteria	Humano	P H	Cgs	154-159	Q83PD3
<i>Shigella flexneri</i>	Bacteria	Humano	P H	ytE	85-80	Q83M91
<i>Vibrio cholerae</i>	Bacteria	Humano	P H	Cgs	98-101	Q9KQP2
<i>Vibrio vulnificus</i>	Bacteria	Humano	P H	Cbl	98-101	Q8DCN8
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Bacteria	Humano	P H	Cgs	98-101	Q87L50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteria	Humano	P H	Ivy-Eta	83-88	Q9KQD1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Bacteria	Humano	P H	Lnt	183-188	Q9Z7Q1
<i>Treponema pallidum</i>	Bacteria	Humano	P H	P17	28-33	P28722
<i>Treponema pallidum</i>	Bacteria	Humano	P H	P17	114-119	P28722
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria	Humano	P H	SBI	168-173	Q52167
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bacteria	Humano	P H	Hipot	14-19	Q8CQP2
<i>Staphylococcus pneumoniae</i>	Bacteria	Humano	P H	7777	11-18	Q86673
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bacteria	Humano	P H	Hipot	11-18	Q8EY21
<i>Staphylococcus mutans</i>	Bacteria	Humano	P H	Hipot	11-18	Q8DWN7
<i>Staphylococcus pyogenes</i>	Bacteria	Humano	P H	SpyM-003	11-18	Q9A208
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteria	Humano	P H	Hipot	11-18	Q82YY4
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Bacteria	Humano	P H	Autotransportada	268-271	CAE31320
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Bacteria	Humano	P H	Prot Mb	113-118	CAE34070
<i>Bordetella parapertussis</i>	Bacteria	Humano	P H	Autotransportada	268-271	CAE40144
<i>Bordetella parapertussis</i>	Bacteria	Humano	P H	Prot Mb	113-118	CAE38480
<i>Helicobacter hepaticus</i>	Bacteria	Animal	P H	DakA	86-101	AAP77253
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bacteria	Animal	P H	Cgs	95-100	Q8ZKN5
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bacteria	Planta	P H	RSp038D	267-272	Q8XST7
<i>Xanthomonas campestris</i>	Bacteria	Planta	P H	XCC3153	49-54	Q8P628
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	Planta	P H	Monooxygenasa	123-128	Q88B22
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	Planta	P H	Ggl	388-373	Q889G3
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	Planta	P H	Pepsint	1429-1434	Q881Q4
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Bacteria	Planta	P H	Racemasa	325-330	Q8UIN3
GRAMNEGATIVOS						
Virus de gripe A	Virus	Humano	P H	PA	323-328	P21427
Virus de gripe A	Virus	Humano	P H	Hemaglutinina	45-49	AAL29588
Virus del herpes simple tipo 2	Virus	Humano	P H	gJ	83-88	P13293
Virus TACARIBE	Virus	Animal	P H	Pol ARN	320-325	P20430
Virus de lengua azul	Virus	Animal	P H	VP2	302-307	Q9VHT8
Citomegalovirus de chimpancé	Virus	Animal	P H	TRS1	24-29	Q8QRS5
LdMPV	Virus	Insectos	P H	ORF80	112-117	Q9YMR4
PROTOZOOS						
<i>Plasmodium falciparum</i>	Protozoo	Humano	P H	Hipot	749-754	Q8DK58
<i>Plasmodium ovale</i>	Protozoo	Humano	P H	Plasmepsina	86-91	Q81183
<i>Anopheles gambiae</i>	Insecto hematófago	Humano	P H	AgCP3043	188-191	EAA08475
<i>Anopheles gambiae</i>	Insecto hematófago	Humano	P H	AgCP11774	288-293	EBA08889
<i>Eimeria tenella</i>	Protozoo	Animal	P H	elmeppsina	138-143	Q9QNE7

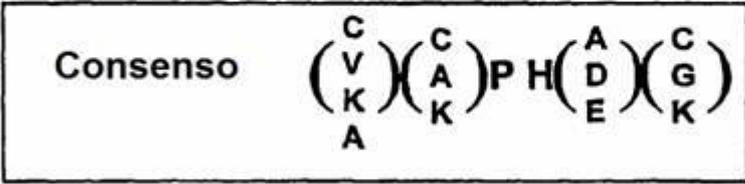


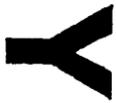
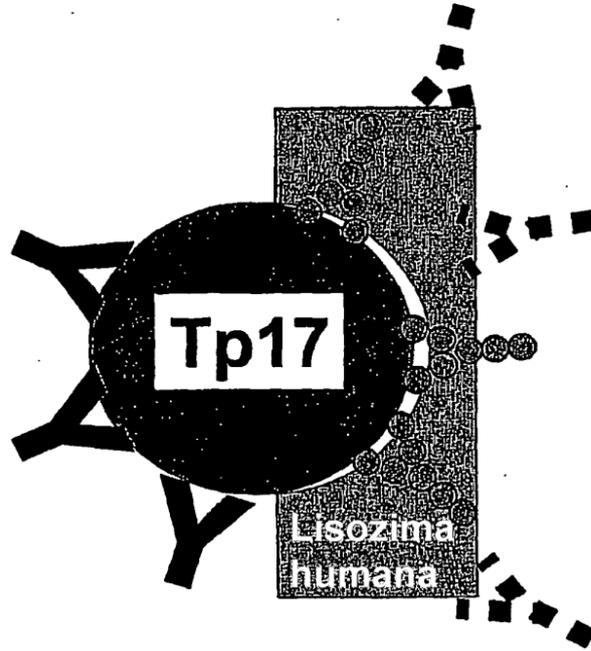
FIG.2

	1	10	20	30	40	50	60	70		
PATO	P00705	KvyyRCEL	RaaHkR	1610nYr	GySlg	NWVCaRky	ESgFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCONGK
PATO	P00706	KvyyRCEL	RaaHkR	1610nYr	GySlg	NWVCaRky	ESgFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCONGK
POLLO	P00638	KvfgRCEL	RaaHkR	h610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
CODORNIZ	P00700	KvfgRCEL	RaaHkR	h610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
CODORNIZ	P00639	KvfgRCEL	RaaHkR	h610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
PINTADA	P00704	KvfgRCEL	RaaHkR	h610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
CODORNIZ	P00701	KvyyRCEL	RaaHkR	h610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
FAISÁN	P22310	KvyyRCEL	RaaHkR	1610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
FAISÁN	P24364	KvyyRCEL	RaaHkR	1610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
PAVO REAL	P19843	KvyyRCEL	RaaHkR	1610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
FAISÁN	P24533	KvyyRCEL	RaaHkR	1610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
PAVO	P00703	KvyyRCEL	RaaHkR	1610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
FAISÁN	P01711	KvyyRCEL	RaaHkR	1610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
FAISÁN	P00702	KvyyRCEL	RaaHkR	1610nYr	GySlg	NWVCaRk	FESnFNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
CHACHALACA	P00707	KlykRCEL	RaaHkR	h610nYr	GySlg	NWVCaRky	ESgNTq	ATNrlt	-dGStOYGLIQNSr	WNCNDGK
CABRA	P37713	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
OVEJA	Q9TUM1	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
CABRA	P37714	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
BOVINO	P04421	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
BOVINO	Q06283	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
BOVINO	Q06284	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
BOVINO	Q06285	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
OVEJA	P17607	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
OVEJA	Q9TUM2	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
CIERVO	P12066	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
BOVINO	Q27936	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
CERDO	P12067	KvydRCEL	FrrLLk	1606nDy	rGvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
CERDO	P12068	KvydRCEL	FrrLLk	1606nDy	rGvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
CERDO	P12069	KvydRCEL	FrrLLk	1606nDy	rGvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
RATA	P00637	KlyeRCEL	FrrLLk	1606nDy	rGvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
RATON	P08905	KvyaRCEL	FrrLLk	1606nDy	rGvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
RATON	P17827	KvyaRCEL	FrrLLk	1606nDy	rGvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
RATA	Q05820	KvfkRCEL	FrrLLk	1606nDy	rGvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
PERRO	P81709	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
CONEJO	P16373	KlyeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
MONO	P79587	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
MONO	P79806	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
CERCOPITECO	P30200	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
RHESUS	P30201	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
BABUINO	P00638	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
TITI	P79158	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
TAMARINO	P79268	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
SAIMIRI	P79294	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
GORILA	P79179	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
HUMANO	P00635	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
ORANGUTAN	P79239	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
GIBÓN	P79180	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
COLOBO	P79538	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
MONO	P79811	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
LANGUR	P07232	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
LANGUR	P87493	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
LANGUR	P79847	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
OVEJA	P80190	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
BOVINO	Q29447	KvvaRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
CAMELLO	P37712	KvvaRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
POSSUM	P53782	KvvaRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
TRUCHA	Q900K3	KvydRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
PLATJA	Q900E5	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
PEZ	Q9PU28	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
PERRO	P81708	KifeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
CABALLO	P11376	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
BURRO	P11375	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
EQUIDNA	P37156	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
HUMANO	Q9H1R9	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
RATÓN	Q9CPX3	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
PALOMA	P00708	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
HOACIN	Q91159	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
RATÓN	Q90811	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
ANDOPHELES	Q17005	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
BOMBAY	P48816	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
CECROPIA	P05105	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
GUSANO DE SEDA	Q9GHL4	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
TRICHOPLUSIA	P50718	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
GUSANO DEL TABACO	Q26353	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
GUSANO TEJEDOR	P50717	KvfeRCEL	ArtLkK	1610dYk	GvSLa	NWVCLLk	ESgNTKATN	Hpgee	STOYGLIQNSr	WNCNDGK
Consenso										

FIG.3A

	71	80	90	100	110	120	13032	SEC ID N°:
PATO	P00705	TP	rekNaCgIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 90
PATO	P00706	TP	radNaCgIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 91
POLLO	P00698	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 92
CODORNIZ	P00700	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 93
CODORNIZ	P00699	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 94
PINTADA	P00704	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 95
FAISÁN	P22910	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 96
FAISÁN	P24364	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 97
PAVO REAL	P19849	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 98
FAISÁN	P24533	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 99
PAVO	P00703	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 100
FAISÁN	P01711	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 101
FAISÁN	P00702	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 102
CHACHALACA	P00707	TP	gerNlCnIpcSvLLraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 103
CABRA	P37713	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 104
OVEJA	09TUK1	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 105
CABRA	P37714	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 106
BOVINO	P00421	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 107
BOVINO	006283	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 108
BOVINO	006284	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 109
BOVINO	006285	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 110
OVEJA	P17607	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 111
OVEJA	09TUM2	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 112
CIERVO	P12066	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 113
BOVINO	027996	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 114
CERDO	P12067	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 115
CERDO	P12068	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 116
CERDO	P12069	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 117
RATA	P00697	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 118
RATÓN	P08905	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 119
RATÓN	P17897	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 120
RATA	005820	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 121
PERRO	P01709	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 122
CONEJO	P16973	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 123
MONO	P79587	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 124
MONO	P79606	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 125
CERCOPITECO	P30200	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 126
RHESUS	P30201	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 127
BABUINO	P00896	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 128
TITI	P79158	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 129
TAMARINO	P79268	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 130
SARICURÚ	P79294	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 131
GORILA	P79179	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 132
HUMANO	P00695	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 133
ORANGUTÁN	P79239	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 134
GIBÓN	P79180	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 135
COLOBO	P79368	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 136
MONO	P79811	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 137
LANGUIR	P07232	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 138
LANGUIR	P07493	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 139
LANGUIR	P79847	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 140
OVEJA	P01190	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 141
BOVINO	029447	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 142
CAMELLO	P37712	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 143
POSSUM	P51782	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 144
TRUCHA	0900K3	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 145
PLATUJA	0900E5	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 146
PEZ	09P128	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 147
PERRO	P01708	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 148
CABALLO	P11376	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 149
BURRO	P11375	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 150
EQUIDNA	P37156	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 151
HUMANO	09H1R9	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 152
RATÓN	09CPX3	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 153
PALOMA	P00708	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 154
HOACIN	091159	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 155
RATÓN	09DR11	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 156
AMOPHELES	017005	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 157
BOMBITA	P40816	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 158
CECROPÍA	P05105	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 159
GUSANO DE SEDA	09GHL4	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 160
TRICHOPLUSIA	P00718	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 161
GUSANO DEL TABACO	026353	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 162
GUSANO TEJEDOR	P50717	TP	navDgChVcSvLlraDIIta	svrCAK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 163
Consenso		tp	...n.c.l.c.e.l.l.d.f.t.a...CRK	rIVeDgdGnn	AVVAVHrnr	CrGtDvSkuir	6Cr1 - 164	

FIG.3B



Anticuerpos capturados por kits convencionales que contienen solamente Tp17



Anticuerpos capturados por kits que contienen Tp17 y lisozima humana

FIG.4

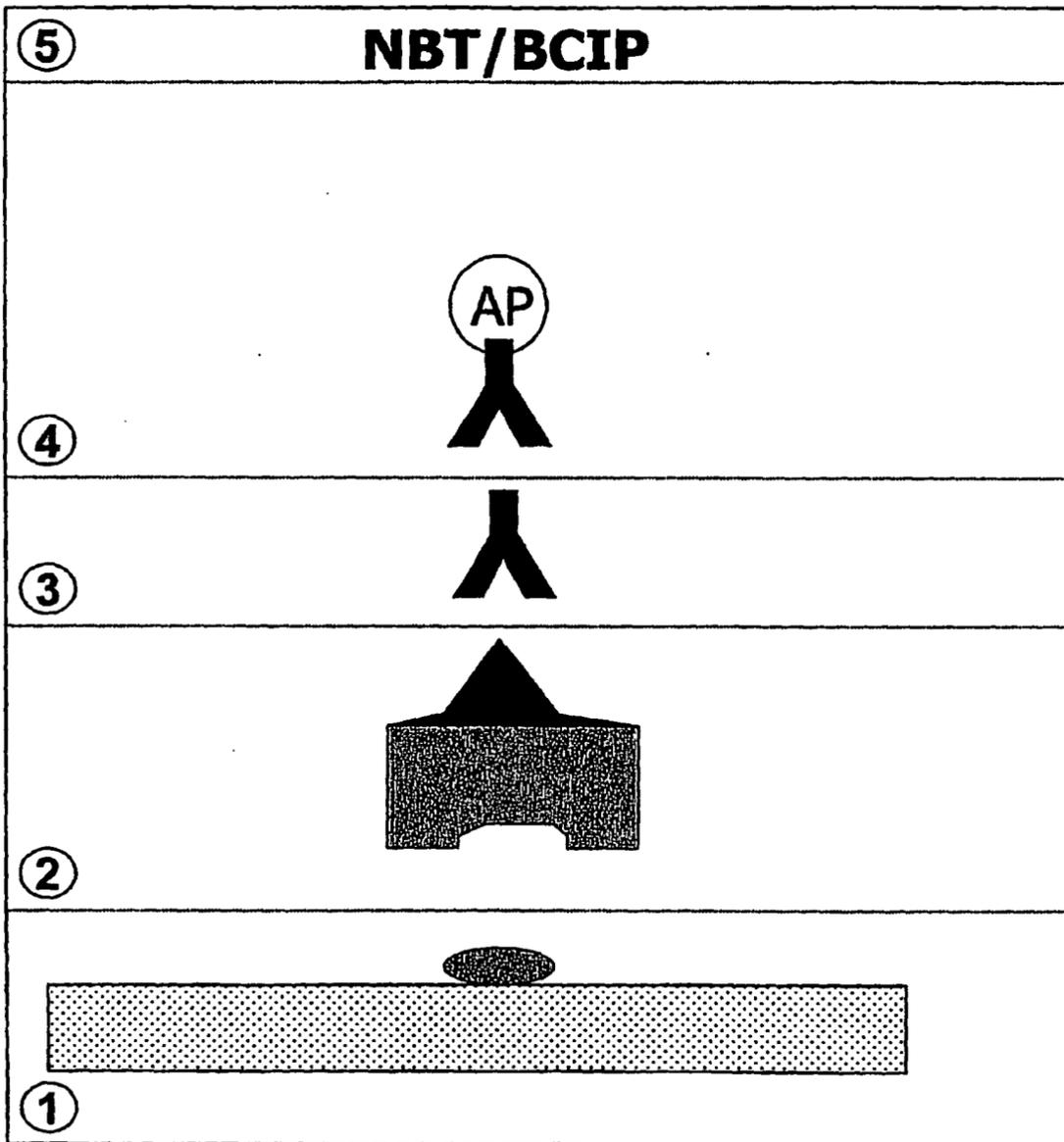


FIG.5

GST

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu
1 ATG TCC OCT APA CTA GGT YAT TGG AAA ATT AAG GGC CTT GTG CRA CCC ACT CGA CTT CTT
TAC AGG GGA TAT GAT CCA ATA ACC TTT FAA TTC CCG GAA CAC GTT GGG TGA GCT GAA GAA
Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys
61 TTG GAA TAT CTT GAA GAA AAA TAT GAA GAG CAT TTG TAT GAG CGC GAT GAA GGT GAT AAA
AAC CTT ATA GAA CTT CTT TTT ATA CTT CTC GTA AAC ATA CTC GCG CTA CTT CCA CTA TTT
Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp
121 TGG CGA AAC AAA AAG TTT GAA TTG GGT TTG GAG TTT CCC AAT CTT CCT YAT TAT ATT GAT
ACC GCT TTG TTT TTC AAA CTT AAC CCA AAC CTC AAA GGG TTA GAA GGA ATA ATA TAA CTA
Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
181 GGT GAT GTT AAA FTA ACA CAG TCT ATG GCC ATC ATA CGT TAT ATA GCT GAC AAG CAC AAC
CCA CTA CAA TTT AAT TGT GTC AGA TAC CGG TAG TAT GCA ATA TAT CGA CTG TTC GTG TTG
Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu
241 ATG TTG GGT GGT TGT CCA AAA GAG CGT GCA GAG ATT TCA ATG CTT GAA GGA GCG GTT TTG
TAC AAC CCA CCA ACA GGT TTT CTC GCA CGT CTC TAA AGT TAC GAA CTT CCT CGC CAA AAC
Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val
301 GAT ATT AGA TAC GGT GTT TCG AGA ATT GCA TAT AGT AAA GAC TTT GAA ACT CTC AAA GTT
CTA TAA TCT ATG CCA CAA AGC TCT TAA CGT ATA TCA TTT CTG AAA CTT TGA GAG TTT CAA
Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys
361 GAT TTT CTT AGC AAG CTA CCT GAA ATG CTG AAA ATG TTC GAA GAT CGT FTA TGT CAT AAA
CTA AAA GAA TCG TTC GAT GCA CTT TAC GAC TTT TAC AAG CTT CTA GCA AAT ACA GTA TTT
Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
421 ACA TAT TTA AAT GGT GAT CAT GTA ACC CAT CCT GAC TTC ATG TTG TAT GAC GCT CTT GAT
TGT ATA AAT TTA CCA CTA GTA CAT TGG GTA GGA CTG AAG TAC AAC ATA CTG CGA GAA CTA
Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys
481 GTT GTT TTA TAC ATG GAC CCA ATG TGC CTG GAT GCG TTC CCA AAA TTA GTT TGT TTT AAA
CAA CAA AAT ATG TAC CTG GGT TAC ACG GAC CTA CGC AAG GGT TTT AAT CAA ACA AAA TTT
Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala
541 AAA CGT ATT GAA GCT ATC CCA CAA ATT GAT AAG TAC TTG AAA TCC ACG AAG TAT ATA GCA
TTT GCA TAA CTT CGA TAG GGT GTT TAA CTA TTC ATG AAC TTT AGG TCG TTC ATA TAT CGT
Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp
601 TGG CCI FTG CAG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGT GGT GGC GAC CAT CCT CCA AAA TCG GAT
ACC GGA AAC GTC CCG ACC GTT CCG TGC AAA CCA CCA CCG CTG GTA GGA GGT TTT AGC CTA
Leu Val Pro Arg Gly Ser Cys Val Ser Cys Thr Thr Val Cys Pro His Ala Gly Lys Ala
661 CTG GIT CCG CGT GGA TCC TGT GTC TCG TGC ACA ACC GTG TGT CCG CAC GCC GGG AAG GCC
GAC CAA GGC CCA CCT AGG ACA CAG AGC ACG TGT TGG CAC ACA GCC CTG CCG CCC TTC CCG
Lys Ala Glu Lys Val Glu Cys Ala Leu Lys Gly Gly Ile Phe Arg Gly Thr Leu Pro Ala
721 AAA CCG GAA AAG CEA CAG TGC CCG TCG AAG GAA CGT AFC TTT CCG GGT ACC CEA CCT CCG
TTT CCG CTT TTC CAT CTC ACG CCG AAC TTC CCT CCA TAG AAA CCC CCA TGC GAT GGA CCG
Ala Asp Cys Pro Gly Ile Asp Thr Thr Val Thr Phe Asn Ala Asp Gly Thr Ala Gln Lys
781 CCC GAT TGC CCG GGA ATC GAT ACG ACT GTG ACG TTC AAC CCG GAT GGC ACT CCG CAA AAG
CGG CTA ACG GGC CCT TAG CTA TGC TGA CAC TCC AAG TTG CCG CEA CCG TGA CCG GTT TTC
Val Glu Leu Ala Leu Glu Lys Lys Ser Ala Pro Ser Pro Leu Thr Tyr Arg Gly Thr Trp
841 GTA GAG CTT GCC CTT GAG AAG AAG TCG GCA CCT TCT CCT CTT ACC TAT CCG GGT ACG TGG
CAY CTC GAA CCG GAA CTC TTC TTC ACC CGT GGA AGA GGA GAA TGG ATA CCG CCA TCC ACC
Met Val Arg Glu Asp Gly Ile Val Glu Leu Ser Leu Val Ser Ser Glu Gln Ser Lys Ala
901 ATG CTA COT GAA CAC CCA ATT CTC CAA CTC TCG CTT CTG TCC TCG CAG CAA TCG AAG CCA
TAC CAT GCA CTT CTG CCT TAA CAG CTT GAG AGC GAA CAC AGG AGC CTC GTT ACC TTC CCF
Pro His Glu Lys Glu Leu Tyr Glu Leu Ile Asp Ser Asn Ser Val Arg Tyr Met Gly Ala
961 CCG CAC CAG AAA GAG CTG TAC GAG CTG ATA GAC AGT AAC TCC GTT CCG TAC ATG GGC CCT
GCC CTG CTC TTT CTC GAC ATG CTC GAC TAT CTG TCA TTG AGC CAA CCG ATC TAC CCG CCA
Pro Gly Ala Gly Lys Pro Ser Lys Glu Met Ala Pro Phe Tyr Val Leu Lys Lys Thr Lys
1021 CCC GCC CCA GGA AAG CCT TCA AAG GAG ATG GCG CCG TTT TAC CTG CTC AAA AAA ACA AAG
GGG CCG CGT CCT TTC GGA AGT TTC CTC TAC CCG GCC AAA ATG CAC GAG TTT TTT TGT TTC
Lys *** (SEC ID N°: 24)
1081 AAA TAG C (SEC ID N°: 30)
TTT ATC G (SEC ID N°: 165)

Tp17

FIG.6

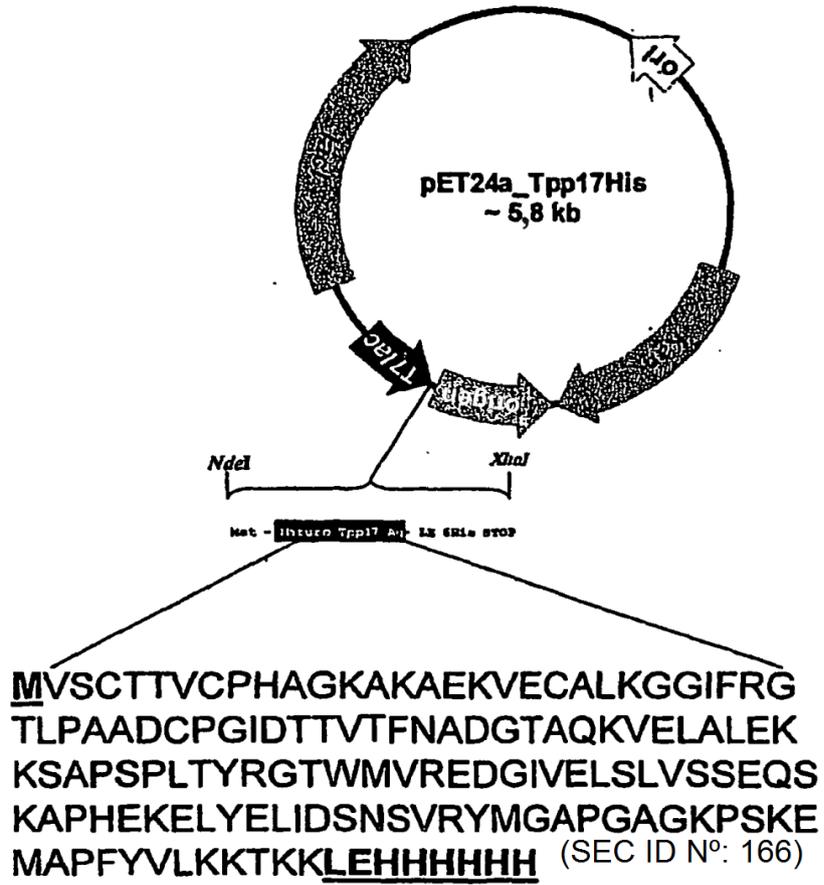


FIG.7

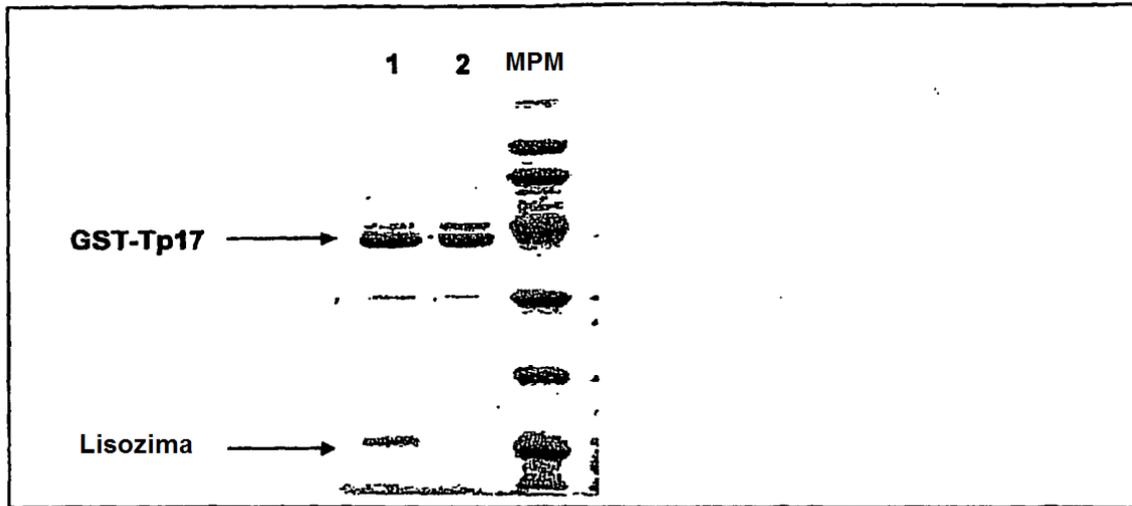


FIG.8A

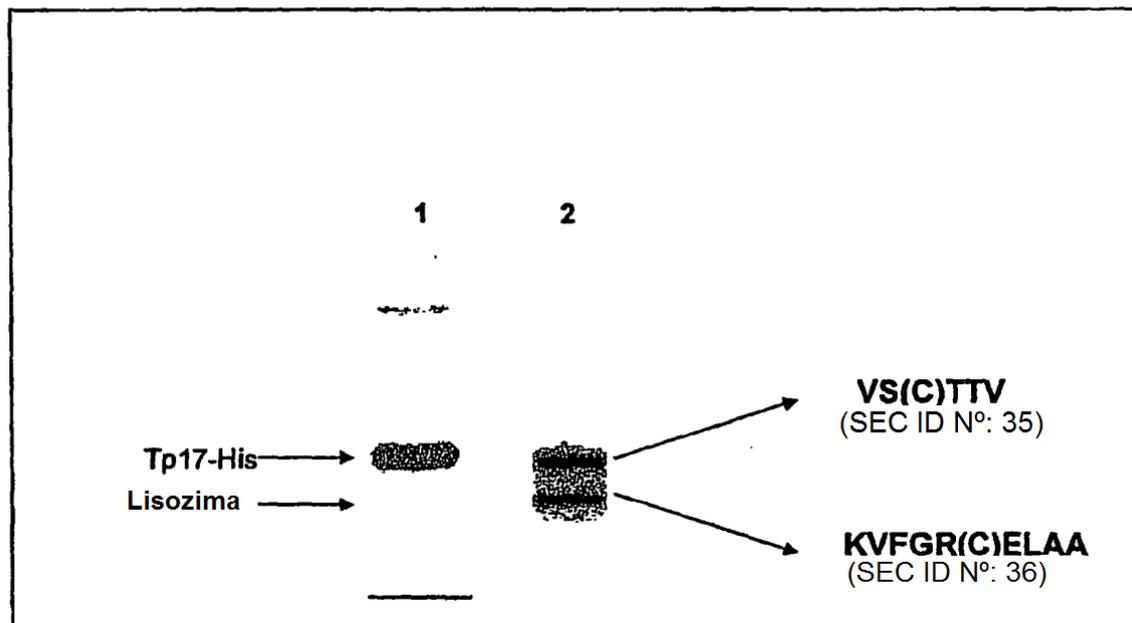


FIG.8B

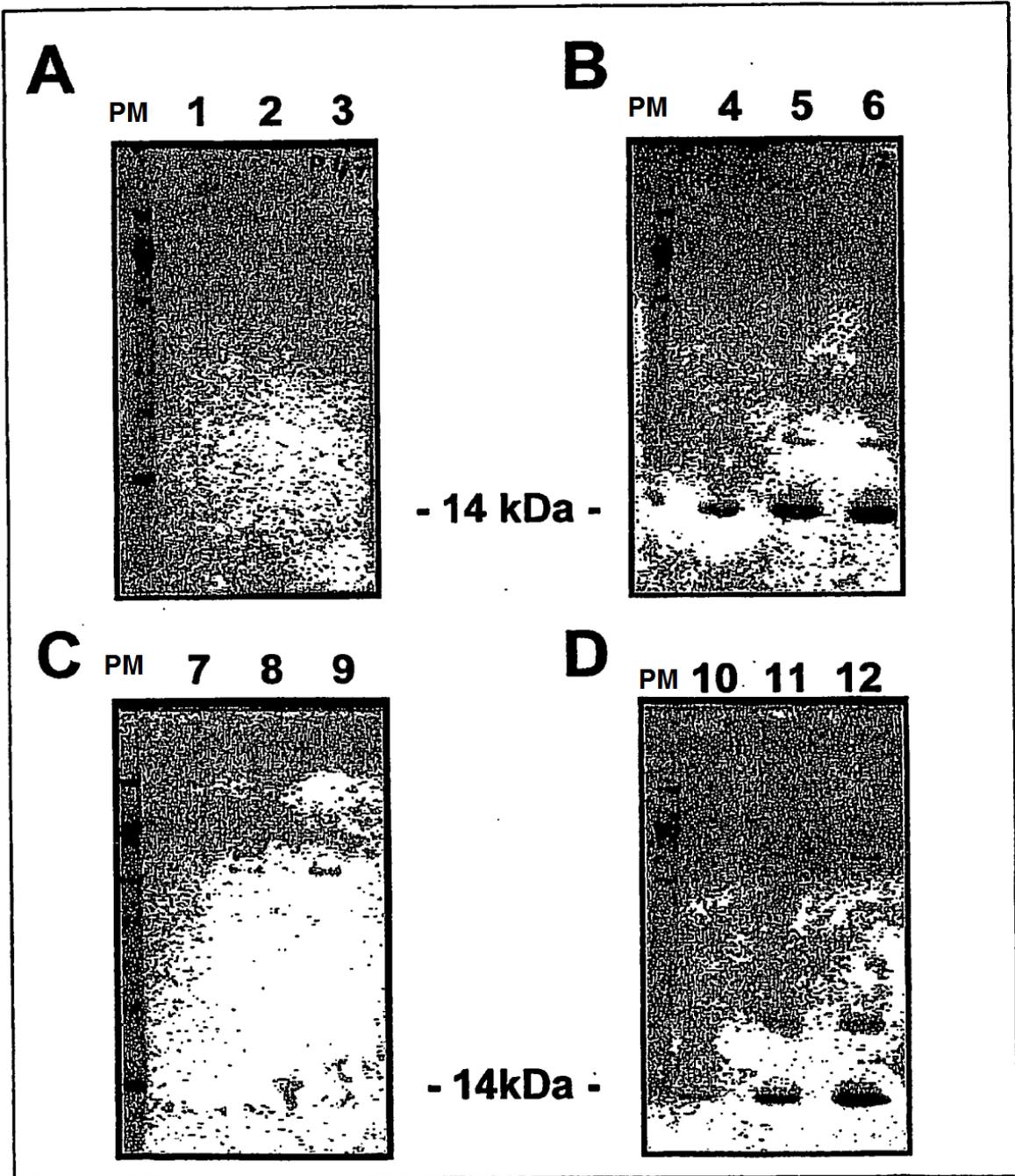


FIG.9

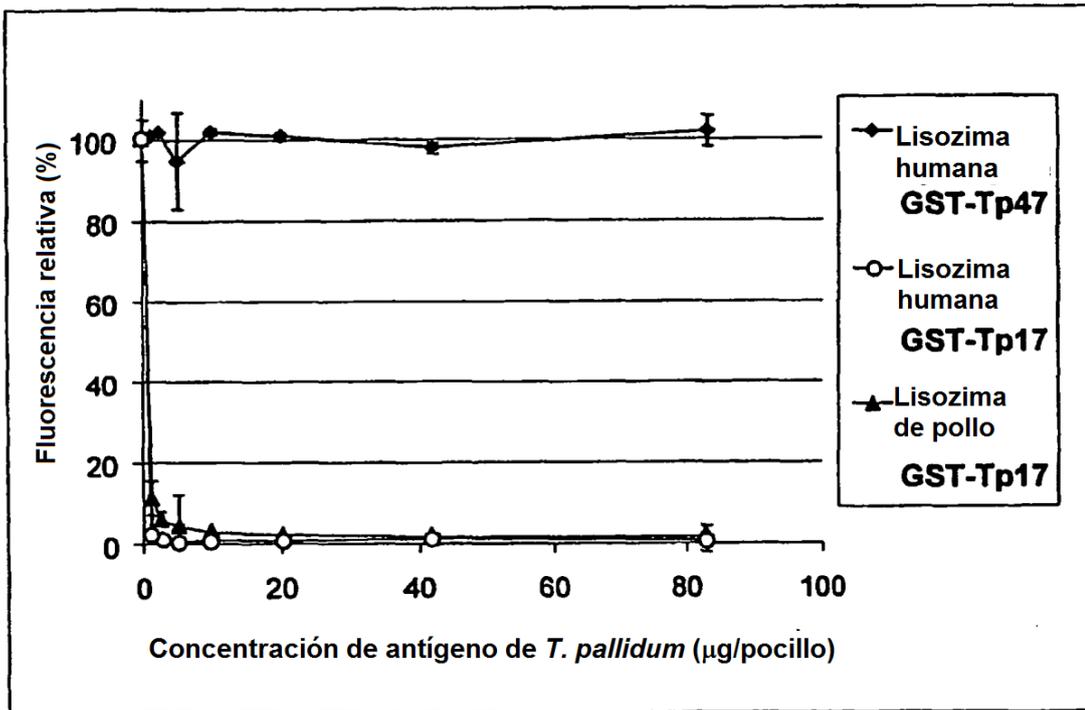


FIG.10

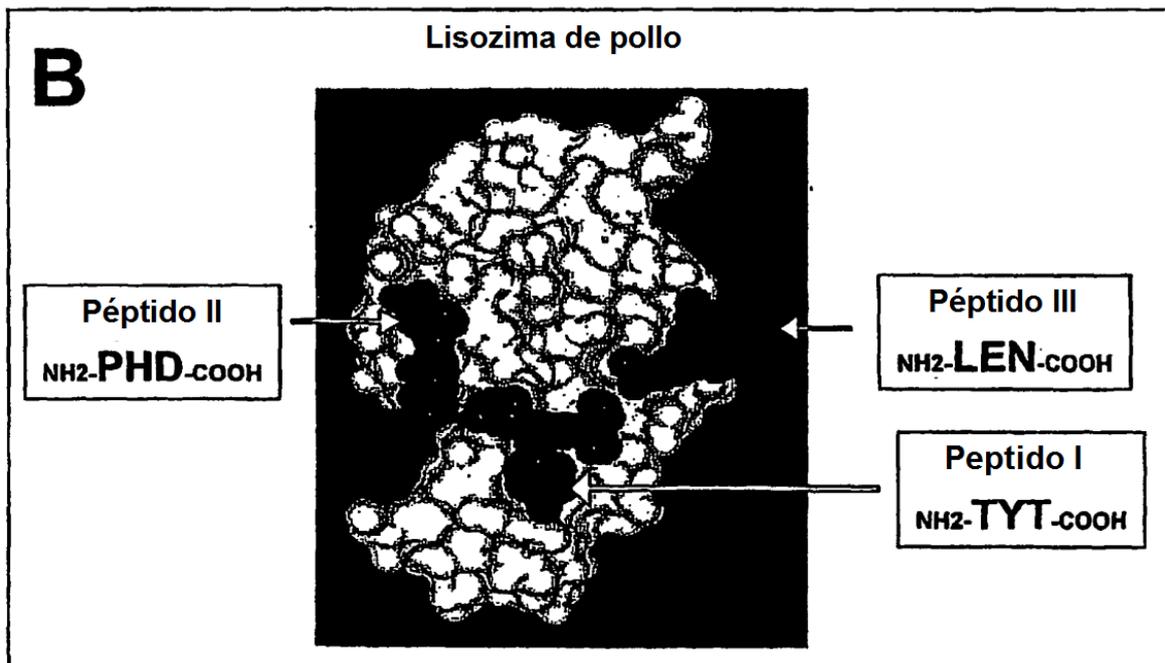
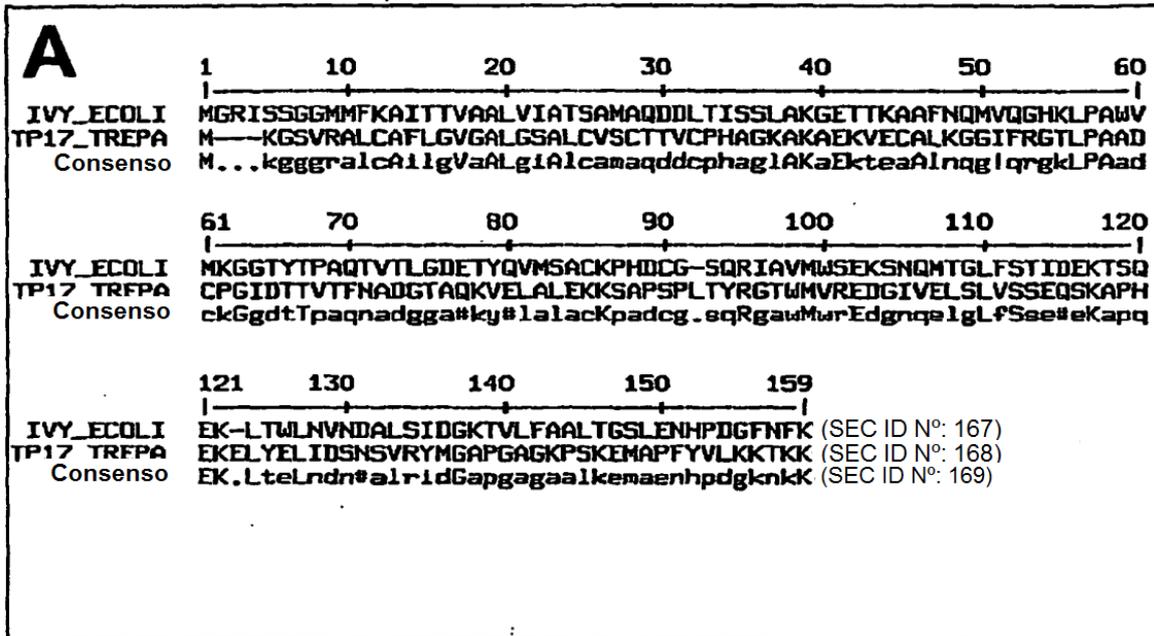


FIG.11

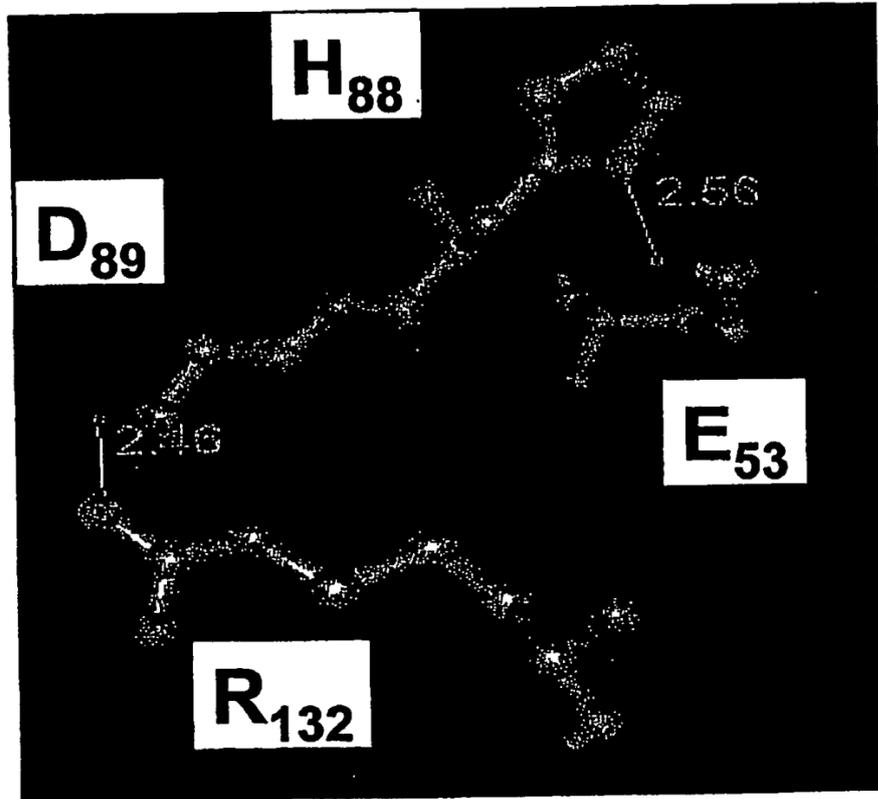


FIG.12

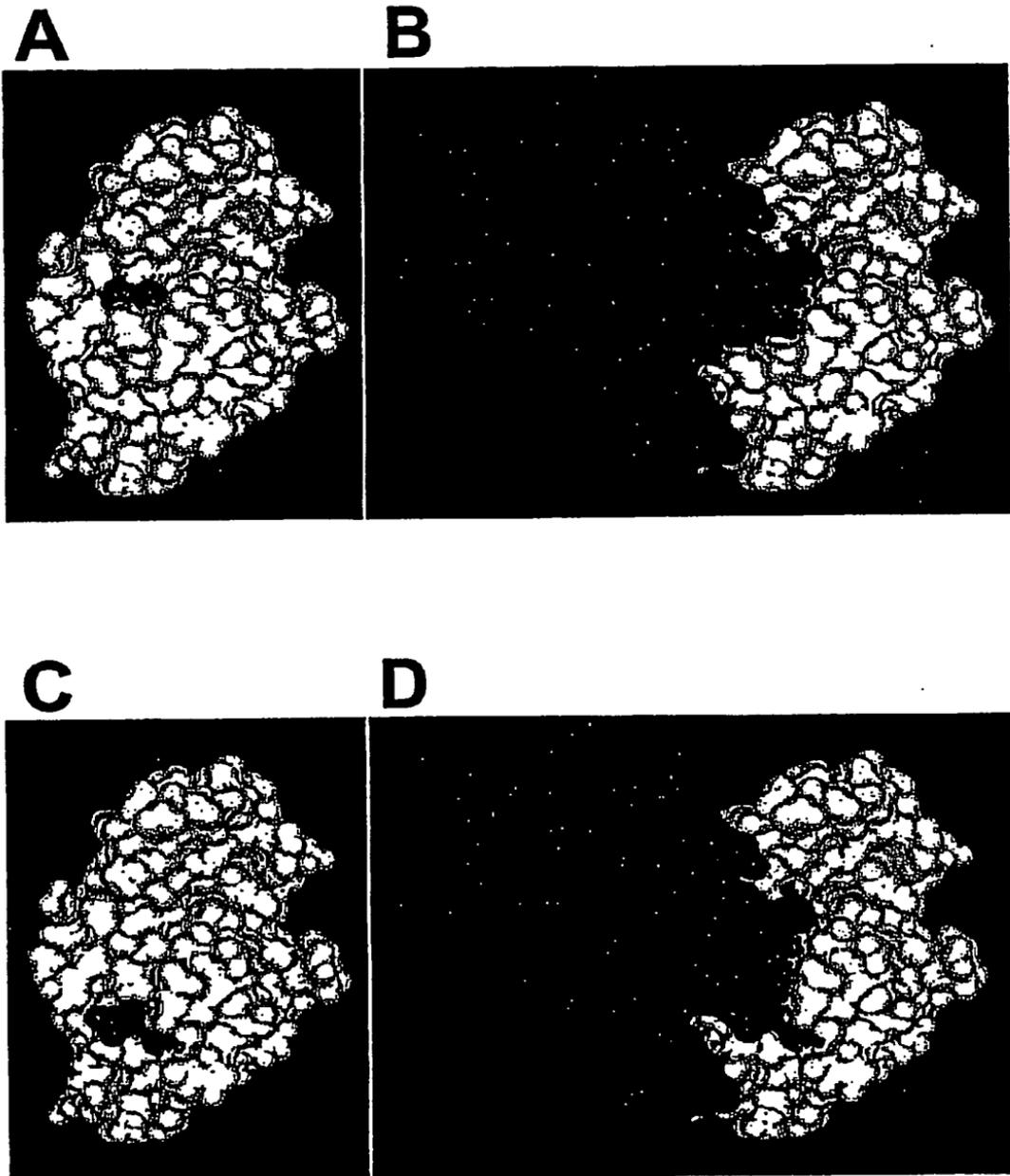
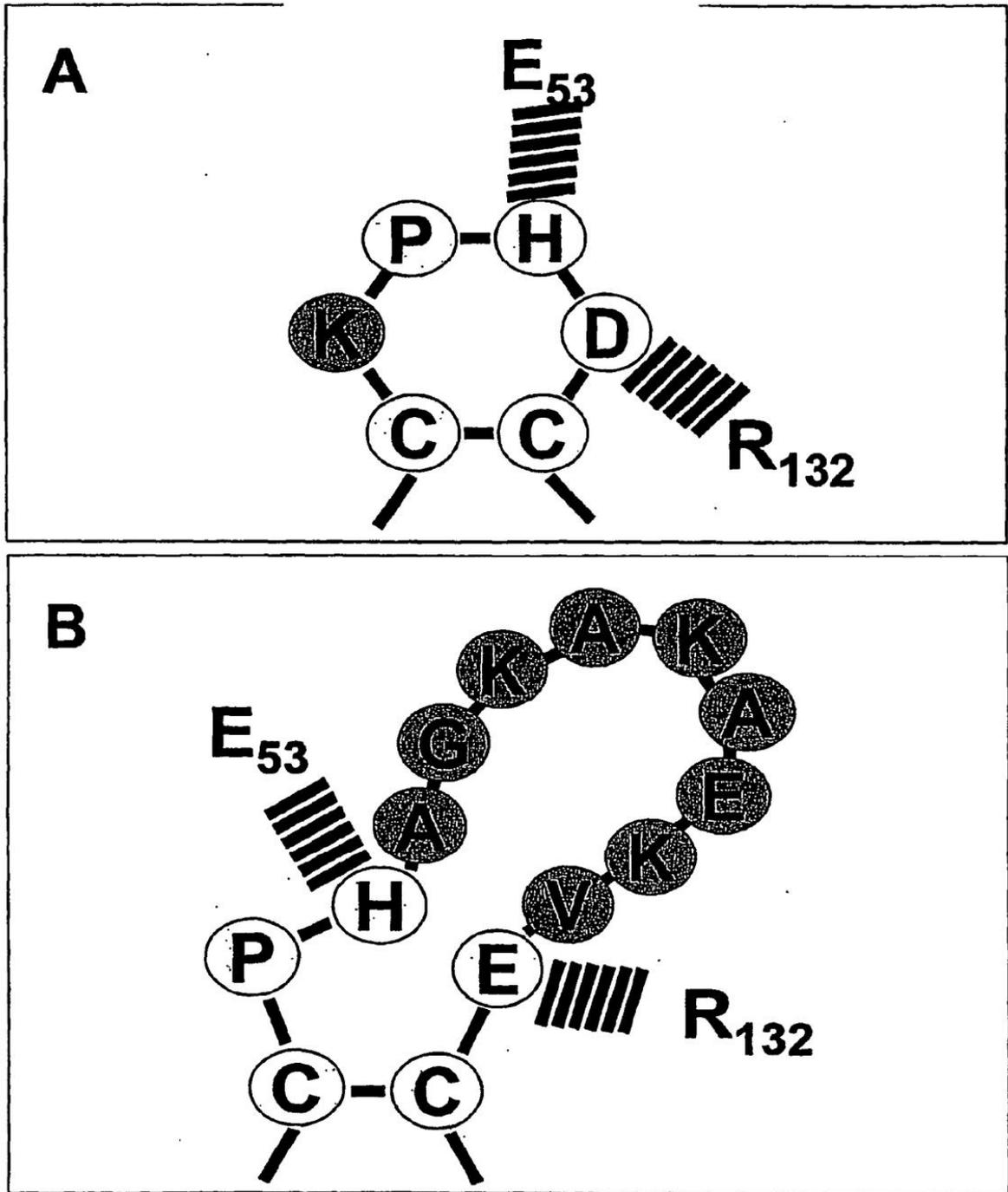


FIG.13



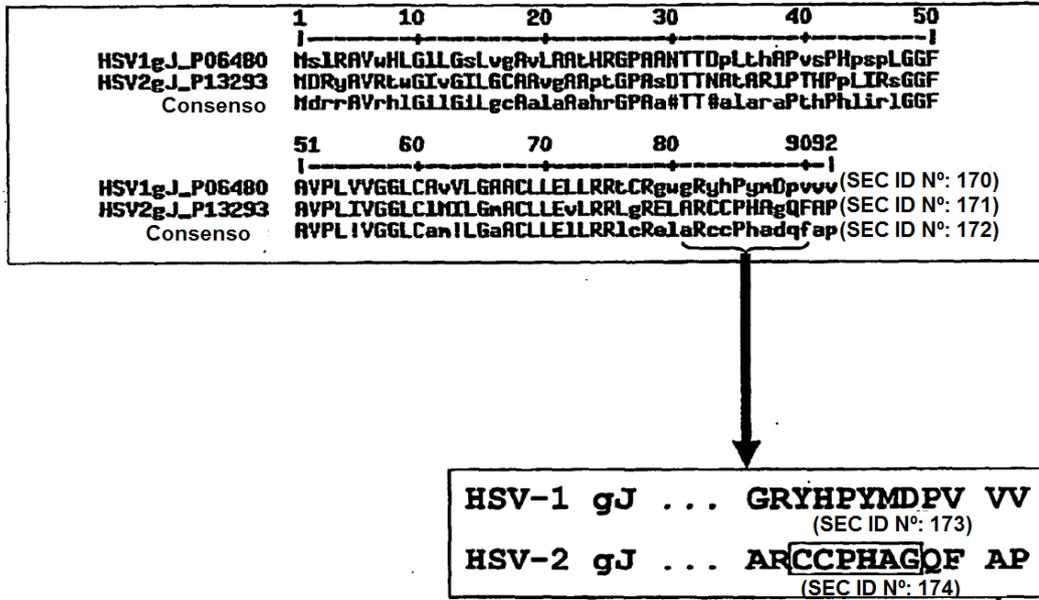


FIG.15

A

ID de suero	Reactivo (R)	R+lis. pollo	R+lis. humana
HPM10	80	80	160
HG38	80	80	320 o más
HG48	80	Negativo	320
HG82	80	80	640

B

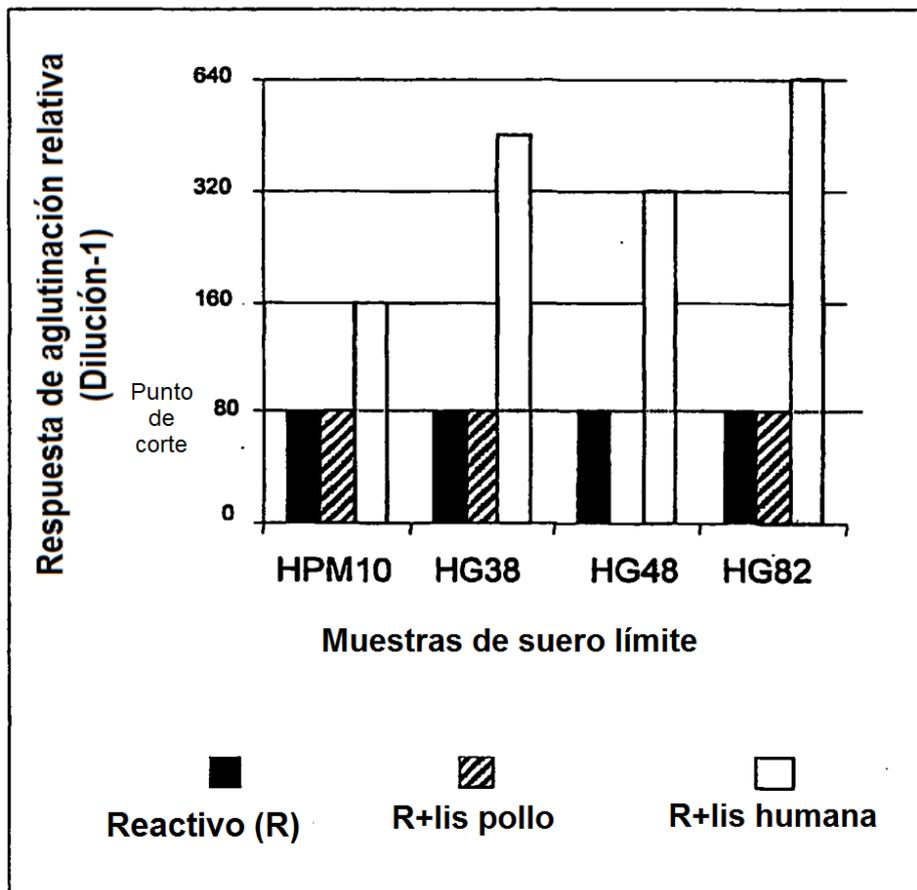


FIG.16

A

ID de suero	Reactivo (R)	R+LisN	R+LisR
Syph71	80	320	320
09-4	160	640	320
09-3	<80	320	160
HSP91	80	640	320
HSP17	160	640	640
HSP3	160	640	320
4932	320	640	640
5895	160	640	640
HG62	640	640	640
HG82	<80	640	640

B

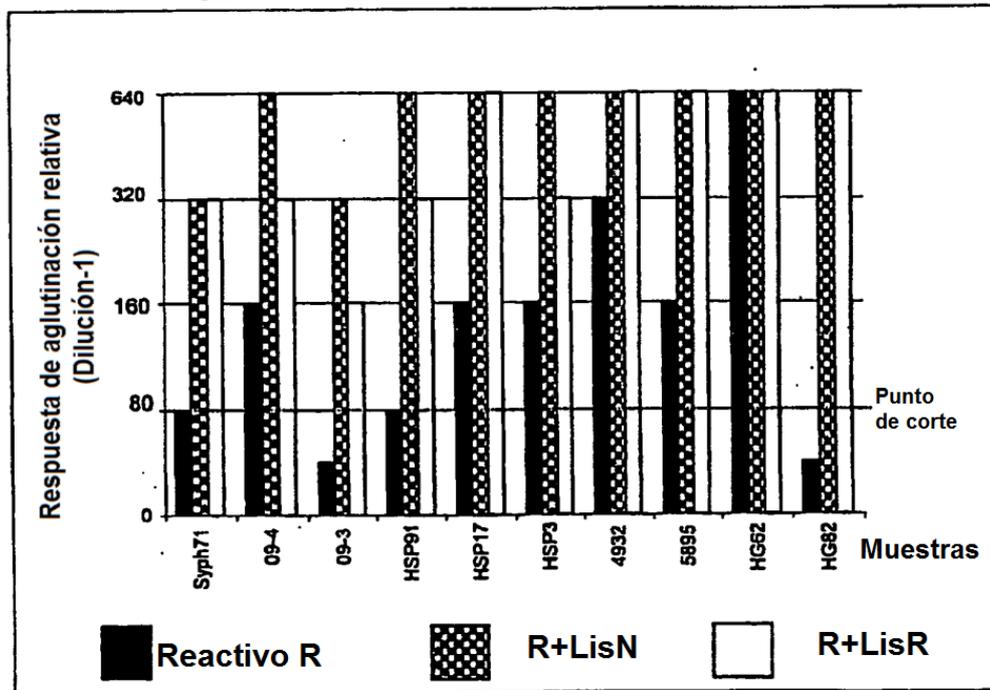


FIG.17

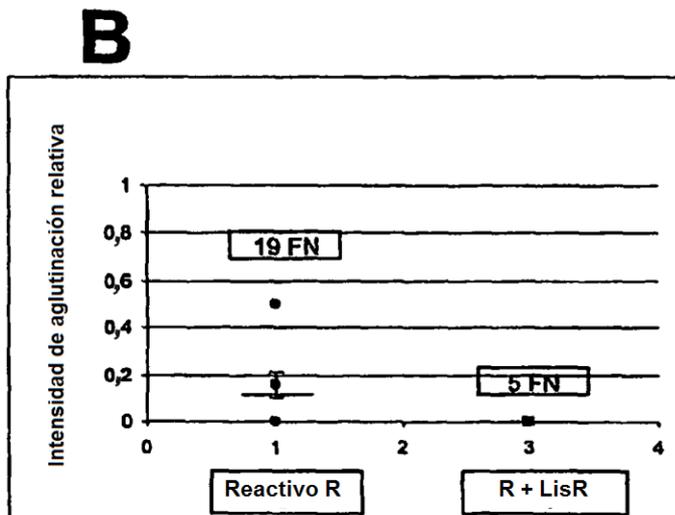
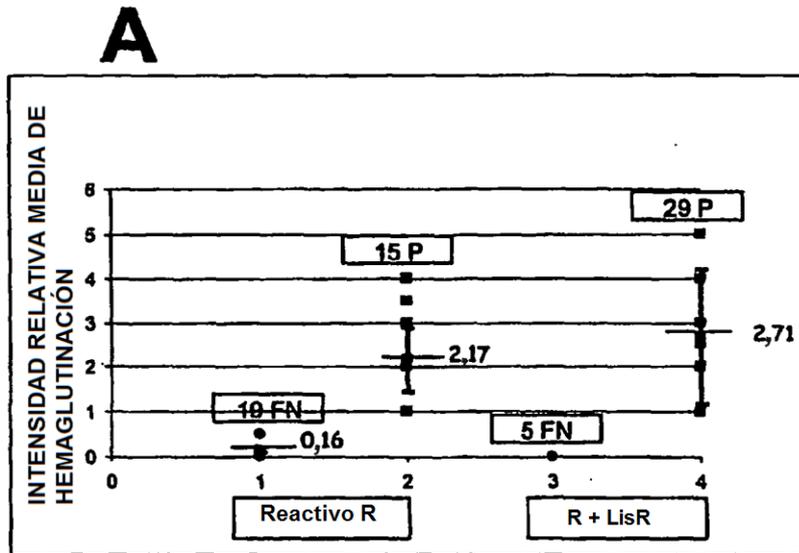


FIG.18

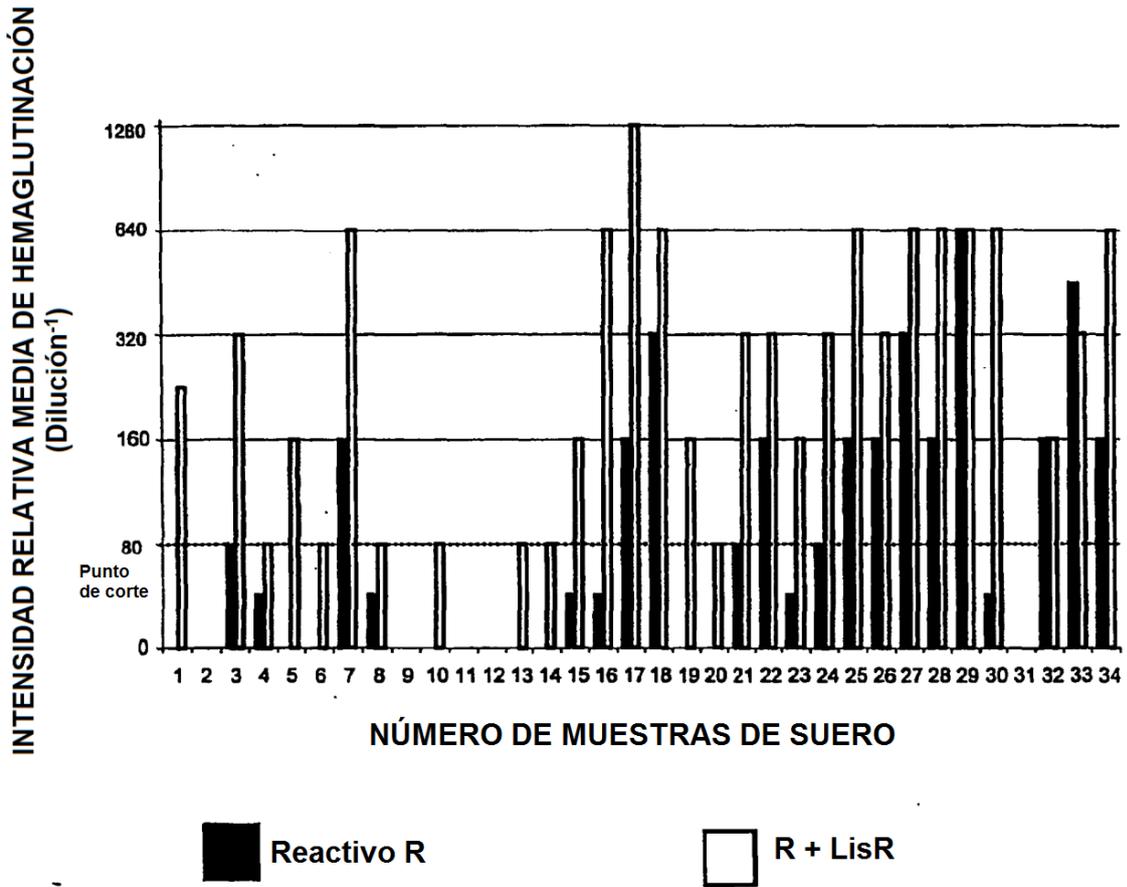


FIG.19

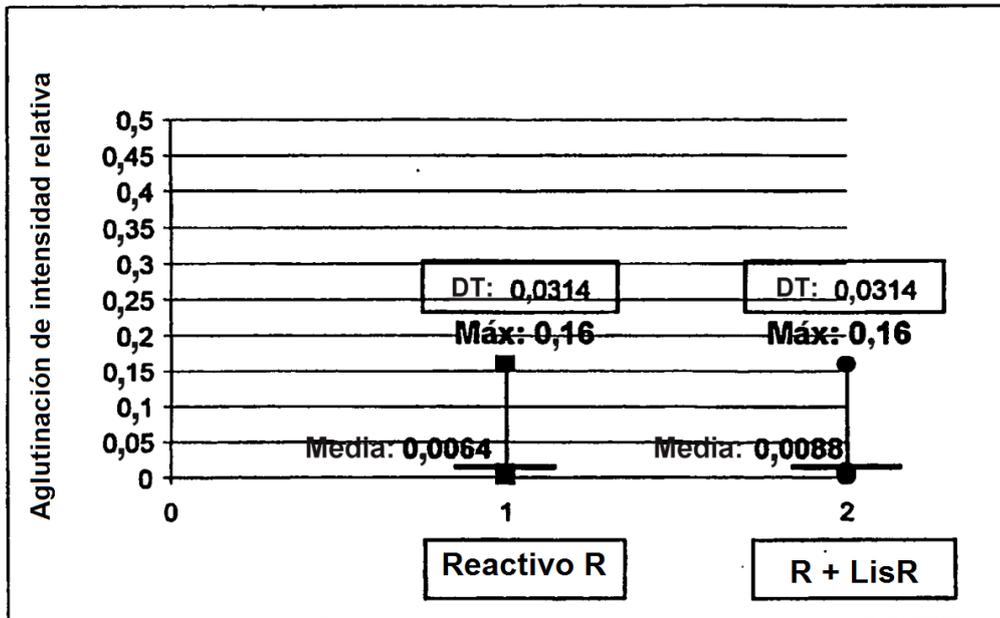


FIG.20

Suero de control		Placa de ELISA convencional	Placa de ELISA + lisozima humana
Control negativo		79	121
Control Positivo		2009	21717
Suero negativo para sífilis			
Código de suero	Placa de ELISA convencional	Placa de ELISA + lisozima humana	
BB01	70	81	
BB02	51	60	
BB03	80	133	
BB04	86	66	
Suero positivo para sífilis			
Código de suero	Placa de ELISA convencional	Placa de ELISA + lisozima humana	
BQ 110	113	1319	
BQ 82	1381	1684	
SC 57 1/10	737	1000	
SC77	1453	1801	

FIG. 21A
ELISA de sífilis de segunda generación

	Tampón diluido de muestra	Tampón diluido de muestra + HuLys	Tampón diluido de muestra + HuLys
	Tampón diluido de conjugado	Tampón diluido de conjugado	Tampón diluido de conjugado + HuLys
	Absorbancia a 450 nm	Absorbancia a 450 nm	Absorbancia a 450 nm
Control negativo	11	11	15
Control positivo	1377	1271	1705
Suero negativo para Syf.			
BB01	5	1	7
BB02	3	0	7
BB03	5	2	57
BB04	7	4	7
Suero positivo para Syf.			
BQ 110	544	460	1717
BQ 82	1408	1407	2843
SC 57 1/10	685	648	1415
SC77	1955	1838	2070

FIG. 21B
ELISA de sífilis de tercera generación

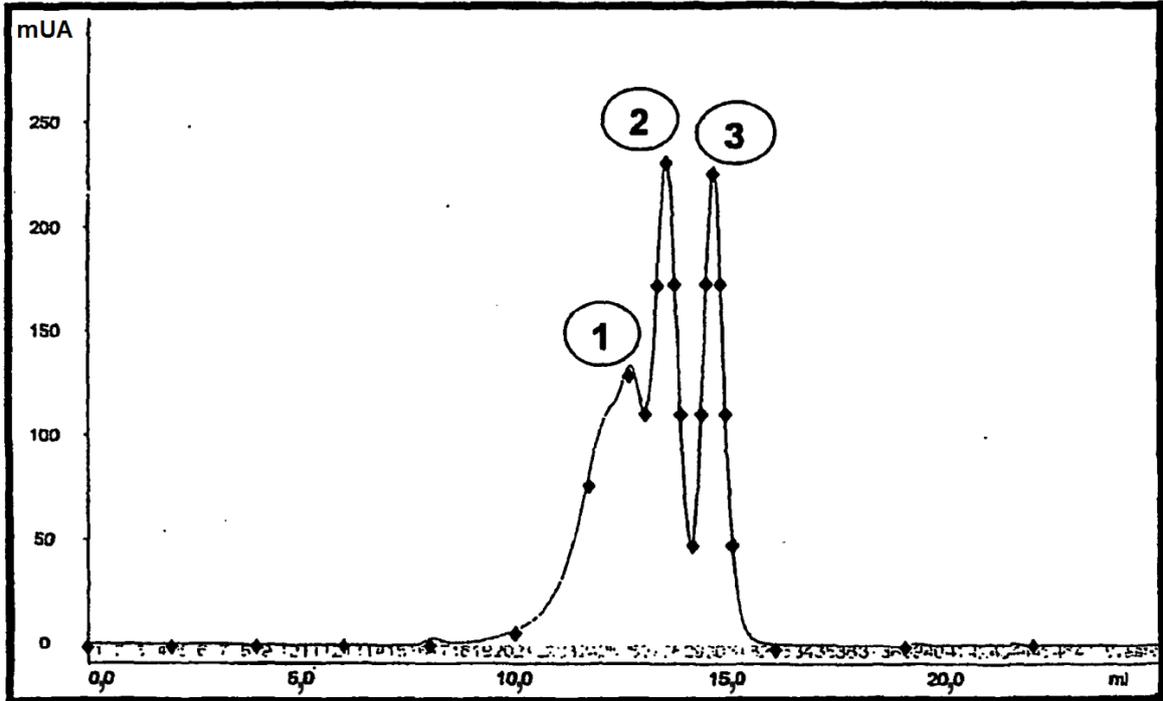


FIG.22

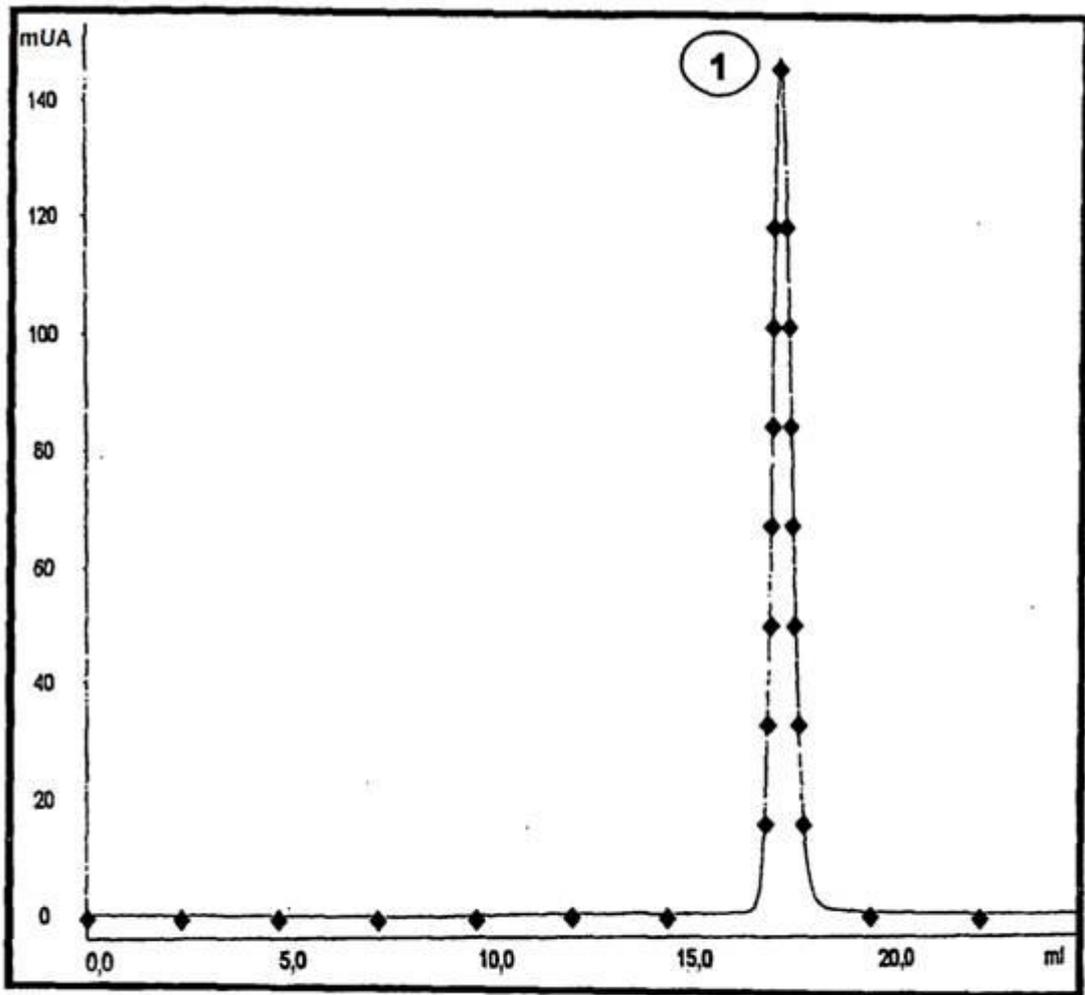


FIG.23

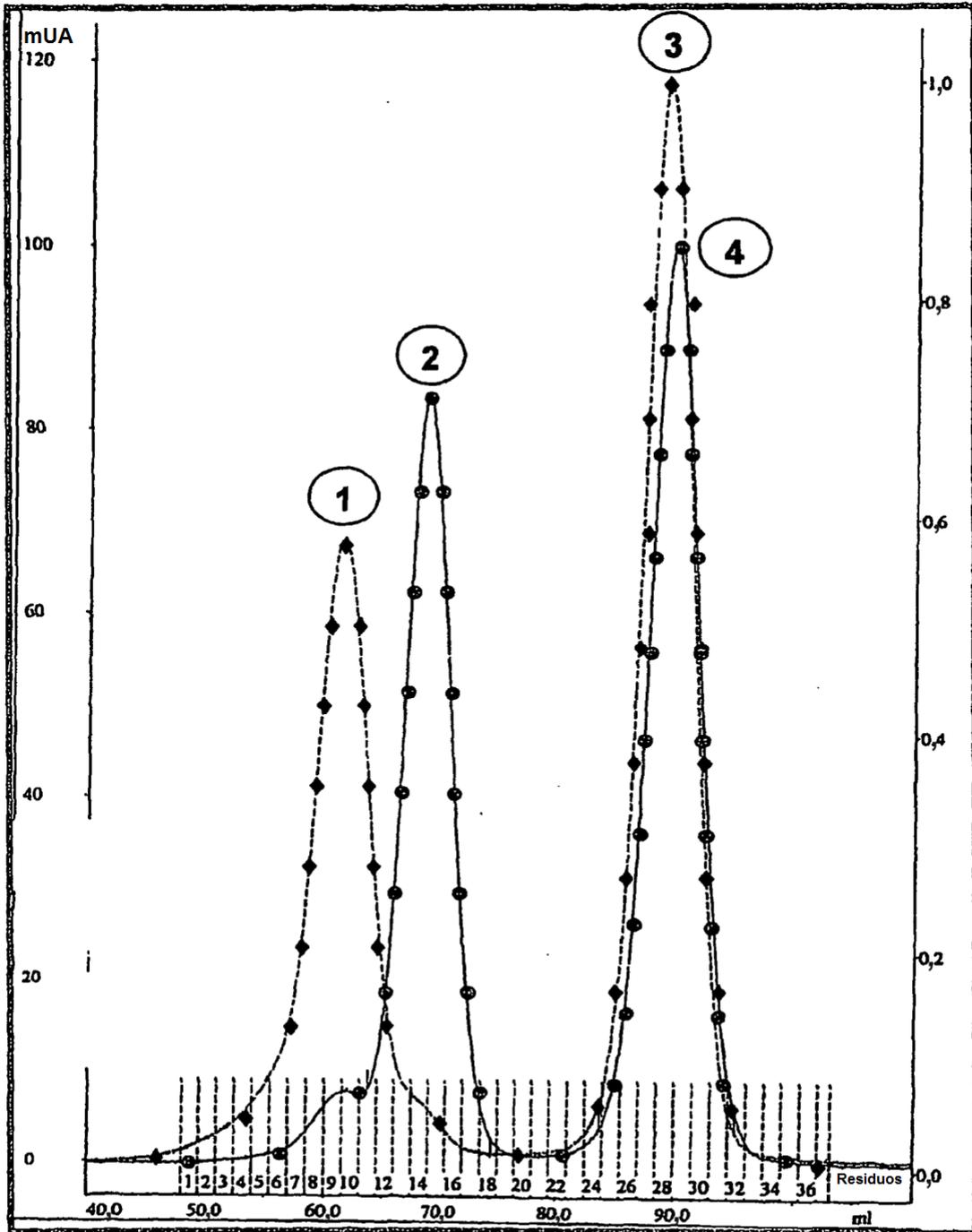


FIG.24

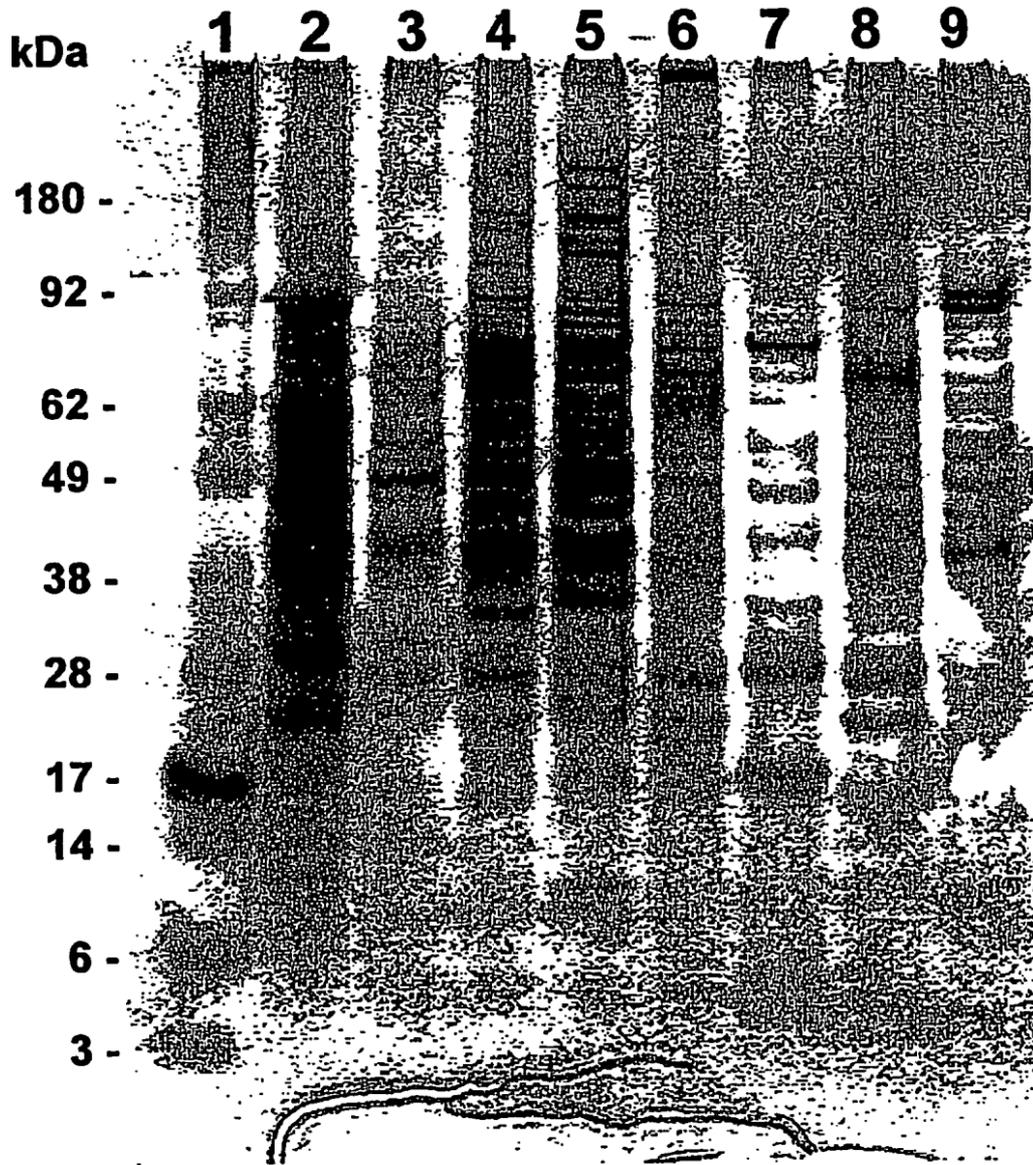


FIG.25

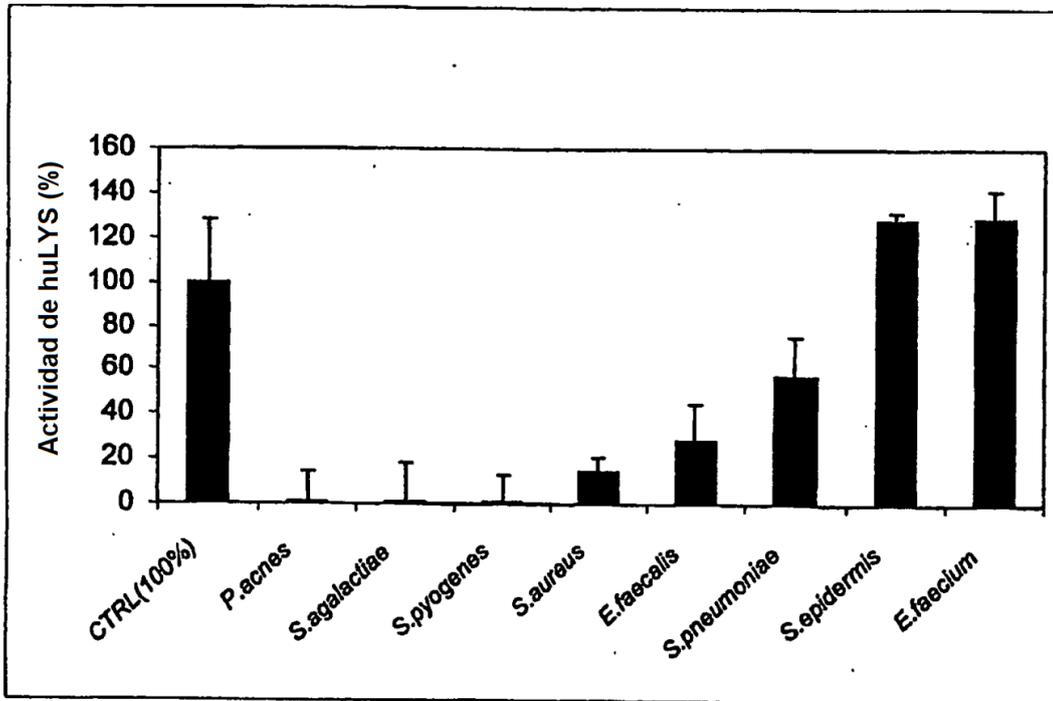


FIG.26

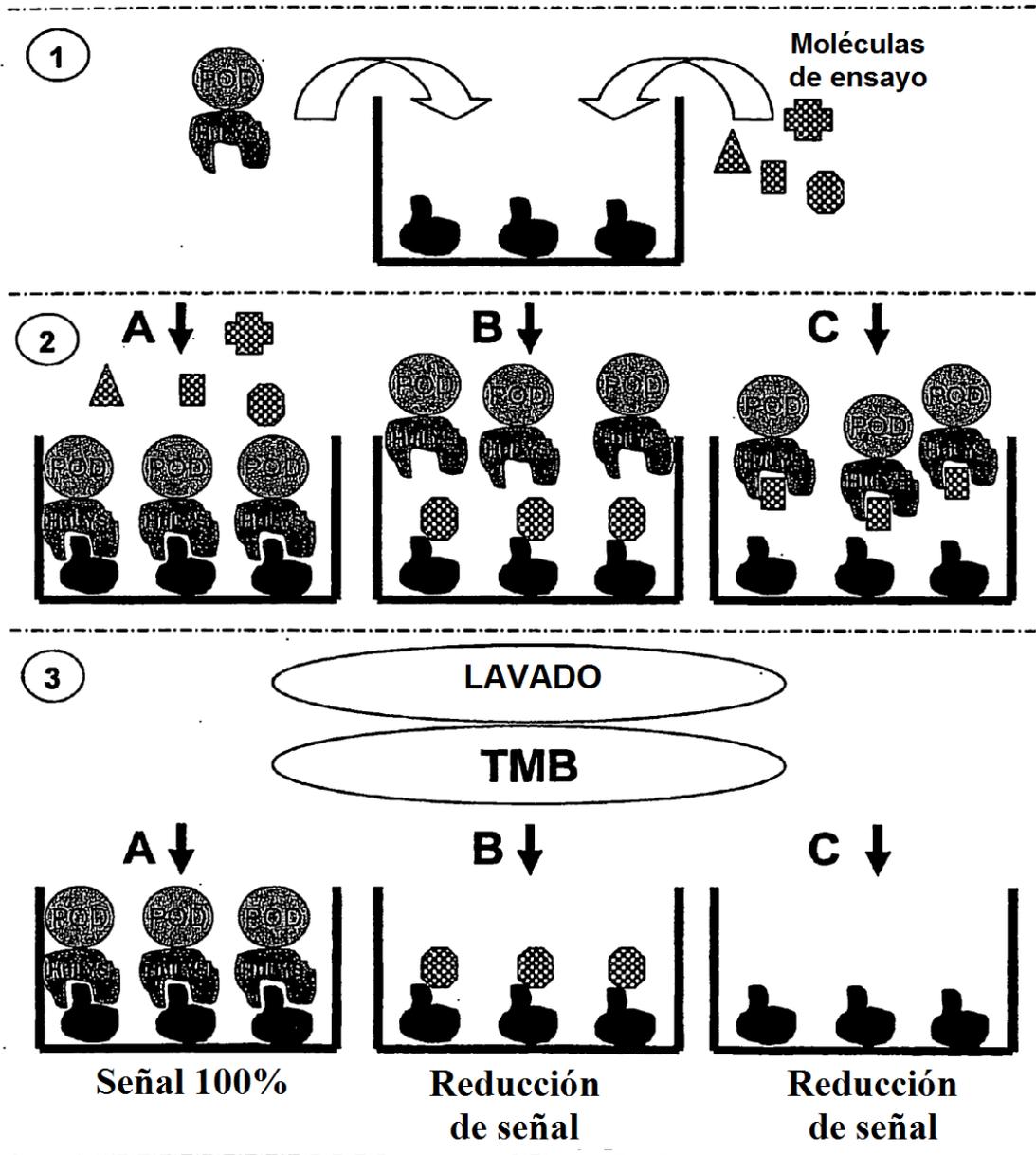


FIG.27

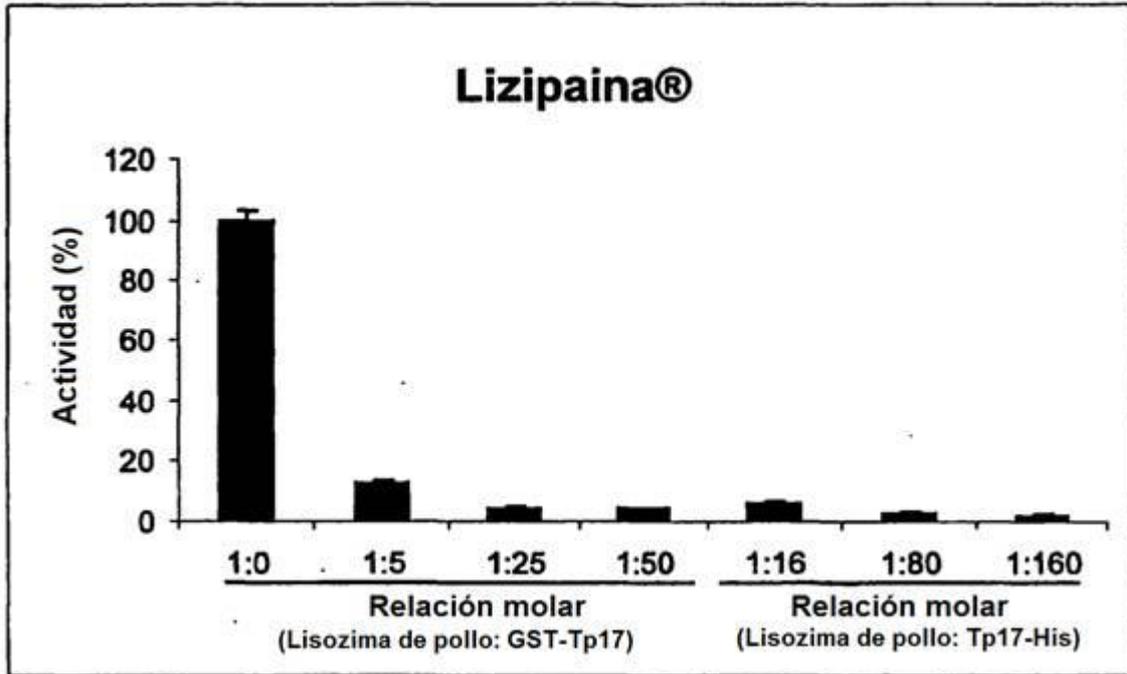


FIG.28A

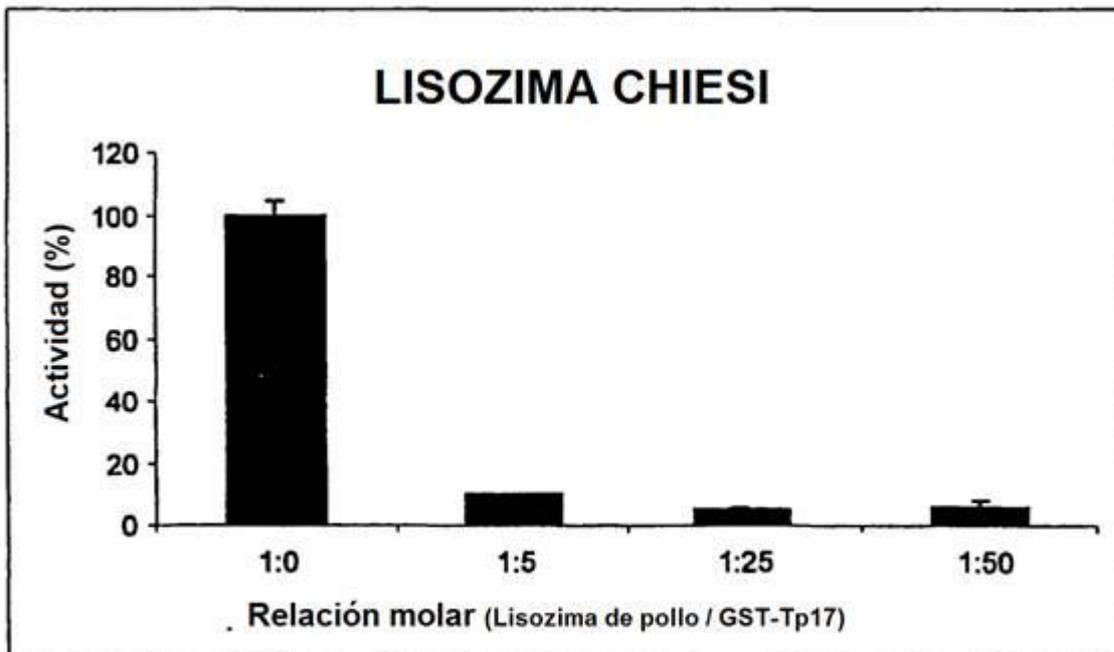


FIG.28B

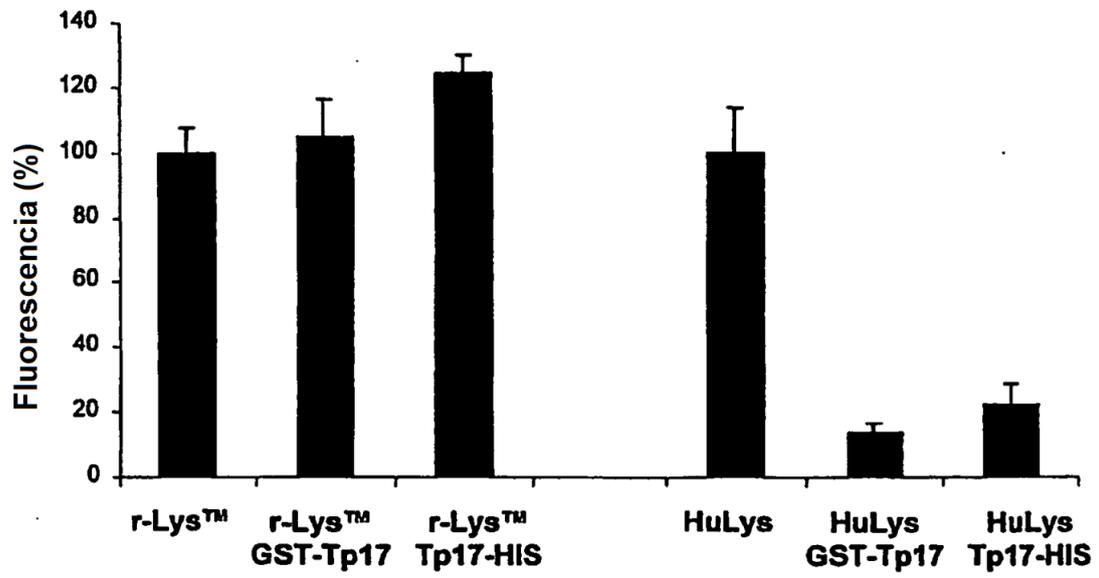


FIG.29

												SEC ID Nº 1
Ec_Ivy	P45502	VM--	ACKPH	-----	DC	SO	IA	M	WS			195
Pa_Ivy	Q9HXB1	VLAN	CKPH	-----	DC	NN	LL	IA	ER			196
Yp_Ivy	P58483	VG--	LCKPH	-----	DC	NN	FM	WA	ES			197
Tp17	P29722	VSCT	VC	PHAGKAKAEKVECAL	L	GG			ER			198
APP770	AAB59502	VTIQ	WCK	-----	RGR	K	QC	KT	PHF	IPYR		199
APP751	NP_958816	VTIQ	WCK	-----	RGR	K	QC	KT	PHF	IPYR		200
APP695	NP_958817	VTIQ	WCK	-----	RGR	K	QC	KT	PHF	IPYR		201

CX (1, 5) [KRH] [AG] [KRH] X (0, 2) [KR] X (0, 1) [EDQN] C

Secuencia
consenso
PROSITE

FIG.30

Ivy de
E. coli

Ivy de
P. aeruginosa

β -APP
humana

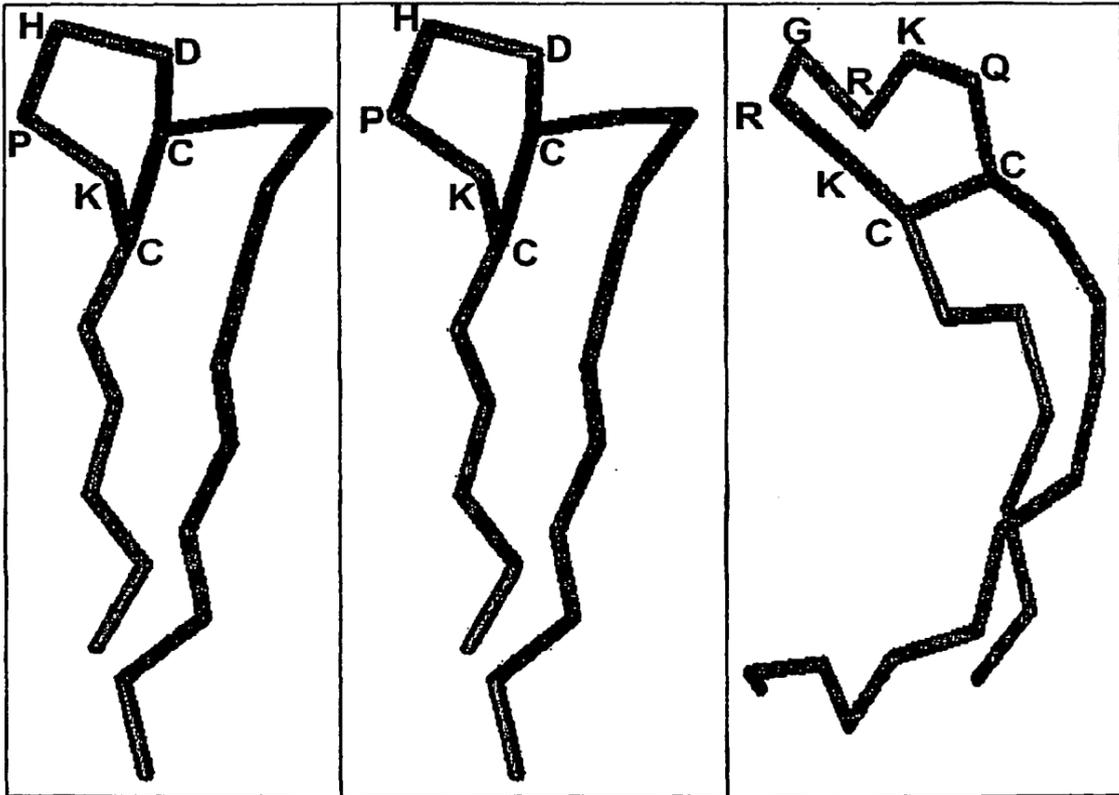


FIG.31

Proteína precursora b-amiloide (beta-APP)

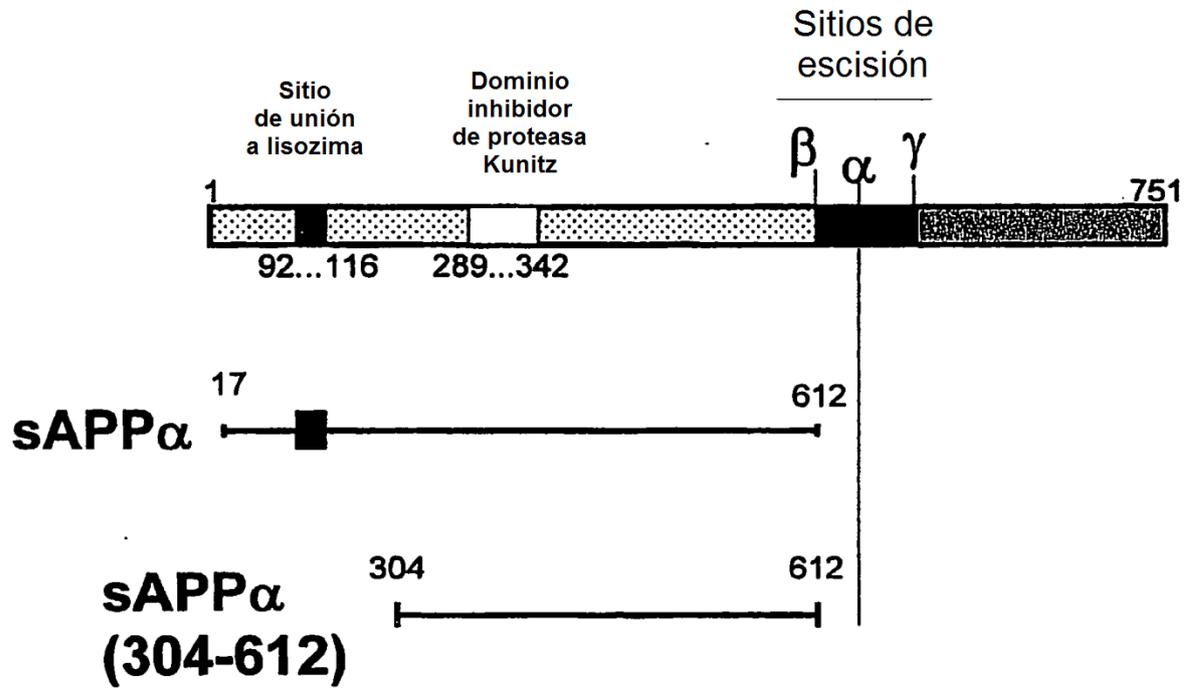


FIG.32

sAPP α



**sAPP α
(304-612)**



FIG.33

Swiss-Prot	DESCRIPCIÓN	HOSPEDADOR	SECUENCIA PEPTÍDICA	LOCALIZACIÓN	SEC ID Nº
P11219	ITAM_HUMANO	Ser humano	C p i p . . . R G R a . . R w Q C	478 a 489	202
Q83278	Proteína beta amiloide A4	<i>Fugu rubripes</i>	C h K G R . . . K . Q C	89 a 108	203
P05067	Proteína beta amiloide A4	<i>Homo Sapiens</i>	C h R G R . . . K . Q C	98 a 105	204
P33601	Proteína beta amiloide A4	<i>Macaca fascicularis</i>	C h R G R . . . K . Q C	90 a 105	205
P12023	Proteína beta amiloide A4	<i>Mus musculus</i>	C k R G R . . . K . Q C	88 a 105	206
P08592	Proteína beta amiloide A4	<i>Rattus norvegicus</i>	C h R G R . . . K . Q C	88 a 105	207
D73083	Proteína beta amiloide A4	<i>Tetraodon fluviatilis</i>	C k K G R . . . K . Q C	89 a 108	208
P03543	Proteína de	Virus del mosaico de la coliflor	C p K Q K . . . K . D C	403 a 410	209
Q8N035	Precursor de beta defensina 105	<i>Homo Sapiens</i>	C k i g . . . R G K e r K . E C	46 a 57	210
Q8Y0V3	GTPasa engC probable	<i>Rattus norvegicus</i>	C f p R G K . . . R a E C	44 a 53	211
P03341	poliproteína Gag	Virus endógeno de babuino	C a y c k e R G H w i K . D C	503 a 516	212
P33458	poliproteína Gag	Virus de artritis encefalitis caprina	C h n c g k R G H m q K . D C	400 a 413	213
P10262	poliproteína Gag	Virus de leucemia felina	C a y c k a K G H w v R . D C	549 a 562	214
P21418	poliproteína Gag	Virus de leucemia de simios de Gibon	C a y c k o K G H w a R . E C	491 a 504	215
P07567	poliproteína Gag	Virus de Mason-Pfizer de simios	C f k c g k K G H f b K . N C	549 a 562	216
P16900	poliproteína Gag	Lentivirus ovino	C h h a g k R G H m q K . D C	405 a 418	217
P03352	poliproteína Gag	Lentivirus visna	C h h c g k R G H m q K . D C	406 a 419	218
Q8KLP4	Glucosa-1-fosfato adeniltransferasa 2	<i>Vibrio cholerae</i>	C a g K G R v a R . D C	243 a 253	219
Q87HD3	Glucosa-1-fosfato adeniltransferasa 3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	C g a K G R v d K . D C	243 a 253	220
Q8D7E0	Glucosa-1-fosfato adeniltransferasa 4	<i>Vibrio vulnificus</i>	C g a K G R v d K . D C	243 a 253	221
Q8H9B1	Histona-lisina-N-metiltransferasa	<i>Homo Sapiens</i>	C e d h . . . R G R m v K h Q C	544 a 556	222
Q8NUK9	Proteína ligada a X de tipo Musclebind	<i>Homo Sapiens</i>	C f d a l . . K G R c t R o N C	54 a 67	223
P27285	Poliproteína estructurada (P130)	Virus sindbis	C a a K A R . . . R . E C	718 a 724	224
Q13591	Precursor de semaforina 6A	<i>Homo sapiens</i>	C y a K G K a . . K e E C	104 a 114	225
Q8H2E6	Precursor de semaforina 6A	<i>Homo Sapiens</i>	C r m K G K h . . K d E C	107 a 117	226
O38464	Precursor de semaforina 6A	<i>Mus musculus</i>	C r m K G K h . . K d E C	107 a 117	227
P28722	Precursor de lipoproteína	<i>Treponema pallidum</i>	C p h a g . . K A K o e K v E C	28 a 42	228
Q8UKW4	Proteína Vav-3	<i>Homo Sapiens</i>	C f k o g a R A H . . . K . E C	544 a 556	229
Q8UB2	Proteína de 4 dominios centrales de diazofuro (WAP)	<i>Homo Sapiens</i>	C r d i p . . K G R k . . R . D C	65 a 76	230
P43448	Precursor de proteína Wnt-10a	<i>Brachydanio rerio</i>	C q h q f . . R G H . . . R w N C	133 a 146	231
P58704	Precursor de proteína Wnt-3a	<i>Homo Sapiens</i>	C q h q f . . R G R . . . R w N C	77 a 88	232
P27467	Precursor de proteína Wnt-3a	<i>Mus musculus</i>	C q h q f . . R G R . . . R w N C	77 a 88	233
P58703	Precursor de proteína de proto-oncogén Wnt-3	<i>Homo Sapiens</i>	C q h q f . . R G R . . . R w N C	80 a 91	234
Q38533	Proteína Gag	VII-1	C w k c g k K G H q m K . D C	11 a 24	235
O57304	Proteína amiloide EL 699	<i>Narka japonica</i>	C k K G R . . . K . Q C	110 a 117	236
Q83818	Proteína de cierre de feromonas	<i>Treponema pallidum</i>	C v r r t i R A R . . . R p Q C	34 a 48	237
Q95205	Proteína de dedo de cinc	<i>Homo Sapiens</i>	C f d a l . . K G R c a R e N C	53 a 68	238
Q8PKH4	Proteína PSD (fragmento)	<i>Homo Sapiens</i>	C k k o g o K G H f a k . D C	133 a 146	239
Q6QK90	Proteína Gag (fragmento)	VII-1	C w k c g k K G H q m K . D C	37 a 50	240
Q6RH28	Proteína beta amiloide isoforma APP751	<i>Canis familiaris</i>	C k K G R . . . K . Q C	80 a 105	241
Q83P03	Proteína Gag (fragmento)	Lentivirus de rumiante pequeño	C h h c g k R G H m q K . D C	188 a 211	242
Q873V4	Proteína Gag	Retrovirus endógeno porcino	C a y c k e K G H w a R . D C	493 a 508	243
Q8TE85	Proteína Gag	HIV-1	C w k c x k X G H q m K . D C	410 a 429	244
Q8TIU0	Proteína Gag (fragmento)	HIV-1	C g r o . . . R G H i o R . . N C	102 a 113	245

FIG.34A

ES 2 405 848 T3

Número de referencia	Descripción	Hospedador	SECUENCIA	Localización	SEC ID N°
Q70SV9	Precursor de proteína de tipo beta amiloide B	<i>Xenopus laevis</i>	C k R G K . . K . Q C	106 a 112	246
Q70BY20	Precursor de proteína de tipo beta amiloide A	<i>Xenopus laevis</i>	C k K G K . . K . Q C	103 a 112	247
Q72ML6	Exonucleasa	<i>Leptospira interrogans</i>	C d w y e . K G K . . K m E C	378 a 386	248
Q76099	P24/p225/p7 (fragmento)	VIH-1	C w k y g k X G H q m k . D C	58 a 69	249
Q7MEEB	ADP-glucosa pirofosforilasa	<i>Vibrio vulnificus</i>	C g e . . . K G R v d k . D C	243 a 253	250
Q7PCN0	AgCP2681	<i>Anopheles gambiae</i> C.PEST	C h n e l r K G H l a R . N C	205 a 218	251
Q7PCN8	AgCP10176	<i>Anopheles gambiae</i> C.PEST	C h n o g k K G H m k k . D C	221 a 234	252
Q7PD62	AgCP11877	<i>Anopheles gambiae</i> C.PEST	C h n c l r K G H l a R . N C	245 a 258	253
Q7RI00	Dedo de cinc potencial en N-recognina	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	C e y e . . K A K e . . K . N C	2024 a 2034	254
Q7RI20	Relacionada con proteína KIAA1035 de Homo sapiens	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	C d f . . . H G H e s a K y N C	946 a 956	255
Q7RJH0	Proteína de desarrollo DG1124	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	C h m o g k K G H o l i K . N C	314 a 327	256
Q7RM64	Proteína fosfatasa 2C	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	C k K G R . . K l D C	370 a 387	257
Q7RMK0	Proteína hipotética	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	C s y l d . H G K e g K n N C	1553 a 1668	258
Q7RQW4	Relacionada con Capn7	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	C v k e n . K A K . . K . N C	620 a 630	259
Q7VF47	Proteína hipotética	<i>Helicobacter hepaticus</i>	C q K G K l . K . Q C	290 a 299	260
Q7YUJ3	Proteína hipotética	<i>Trypanosoma brucei</i>	C t h n f R O R . . K . E C	233 a 244	261
Q7ZJH6	Proteína Gag	VIH-1	C f n o g k R X H l a R . N C	397 a 410	262
Q80S43	Poliproteína estructural	Virus Kyzylgach	C t c . . . K A R . . R . E C	716 a 724	263
Q80S45	Poliproteína estructural	Virus Baband	C b c . . . K A R . . R . E C	716 a 724	264
Q80S47	Poliproteína estructural	Virus Highlands J	C i s K A R . . R . D C	707 a 716	265
Q80S49	Poliproteína estructural	Virus Fort Morgan	C l e R A R . . R . D C	709 a 717	266
Q80S61	Poliproteína estructural	Virus Buggy Creak	C l c R A R . . R . D C	709 a 717	267
Q86JVB	Proteína de tipo Muscblind-EXP40s	Ser humano	C f d s i l . K G R c e R e N C	53 a 68	268
Q86JVB	Proteína de tipo Muscblind-EXP40s	Ser humano	C f d s i l . K G R c s R e N C	53 a 68	269
Q88VU5	Catecol-O-metiltransferasa	Ser humano	C p p w . . R G R . . R e Q C	35 a 46	270
Q86W92	Proteína LOC285498	Ser humano	C d s o l g K G K . . K n E C	82 a 74	271
Q86WY7	Síndrome de Williams Beuren	Ser humano	C r y m n p R A R . . K . N C	65 a 76	272
Q86X08	Proteína Eu-1MTasa1	Ser humano	C e d h . . R G R m v K h Q C	675 a 687	273
Q87100	Proteína de la envoltura	SV	C r d e d y R G H . . K . N C	17 a 28	274
Q87PT6	Proteína hipotética VP1415	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	C n k k l g K G K . . K . E C	603 a 614	275
Q8AD21	Proteína Gag	VIH-1	C f n o g k K G H l a R . N C	127 a 140	276
Q8AD40	Proteína Gag	VIH-1	C f n y g k K G H l a R . N C	346 a 359	277
Q8E7B2	Proteína hipotética	<i>Leptospira interrogans</i>	C d w y e . K G K . . K m E C	252 a 263	278
Q8YBE0	Proteasa	<i>Brucella melitensis</i>	C a h a r a K G H l . K d N C	178 a 192	279
Q80SM0	Poliproteína Gag	VIH-1	C w k c g r K G H q m K . D C	408 a 421	280
Q80MF6	Proteína Gag	VIH-1	C f n o g r K G H l a R . N C	387 a 400	281
Q80QF6	Proteína Gag	VIH-1	C w k c g k X G H q m K . D C	4 a 17	282
Q80RE5	Glicoproteína de envoltura	VIH-1	C l p p d q K G K m . R . N C	182 a 174	283
Q80J16	Env	SV	C r d f d y R G H . . K . D C	3 a 14	284
Q85X00	Proteína de poli.dedos de cinc 2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	C y v o g e K O H l a R . D C	171 a 184	285
Q86RE3	Proteína muscblind de 36 kDa	Ser humano	C f d s i l . K G R c s R e N C	53 a 68	286
Q875B3	P24/NCp7	VIH-1	C f n o g k X G H l a R . N C	41 a 64	287
Q8J120	Proteína Gag	VIH-1	C f n x g k X G H l a R . N C	40 a 63	288
Q8J126	Proteína Gag	VIH-1	C f n o g k X G H l a R . N C	38 a 61	289
Q8J128	Proteína Gag	VIH-1	C f n c g x X G H l a K . N C	38 a 61	290
Q8J185	Proteína Gag	VIH-1	C f n c g k X G H l a K . N C	37 a 60	291
Q8J193	Proteína Gag	VIH-1	C f n e g k X G H l a R . N C	14 a 27	292
Q8J197	Proteína Gag	VIH-1	C f n e g k X G H l a R . N C	37 a 60	293
Q8USJ7	Proteína hipotética	<i>Trypanosoma brucei</i>	C t l h n f R O R . . K . E C	134 a 146	294

FIG.34B

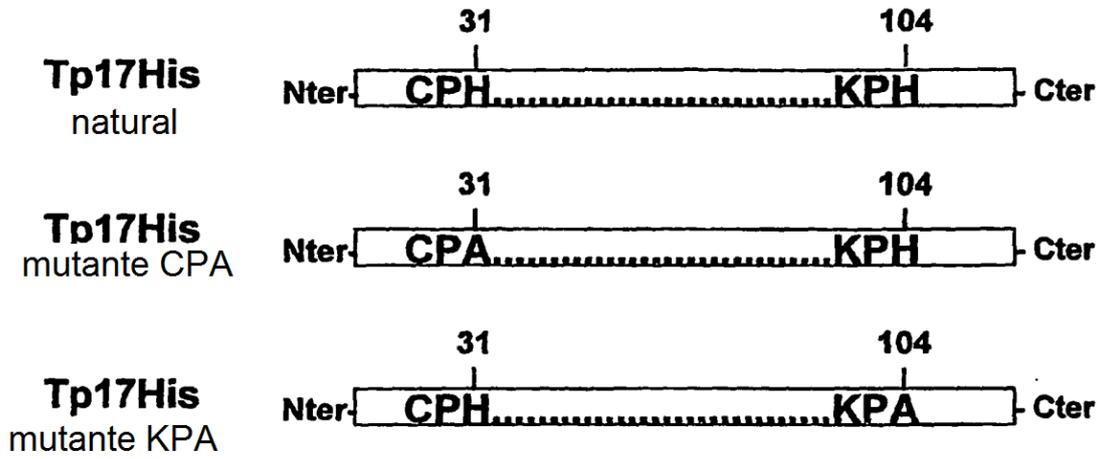


FIG.35A

GST-Tp17	Inhibición de lisozima (%)	
	huLYS	chkLYS
natural	100	100
mutante CPA	49 ± 4	42 ± 2
mutante KPA	51 ± 4	58 ± 6

FIG.35B

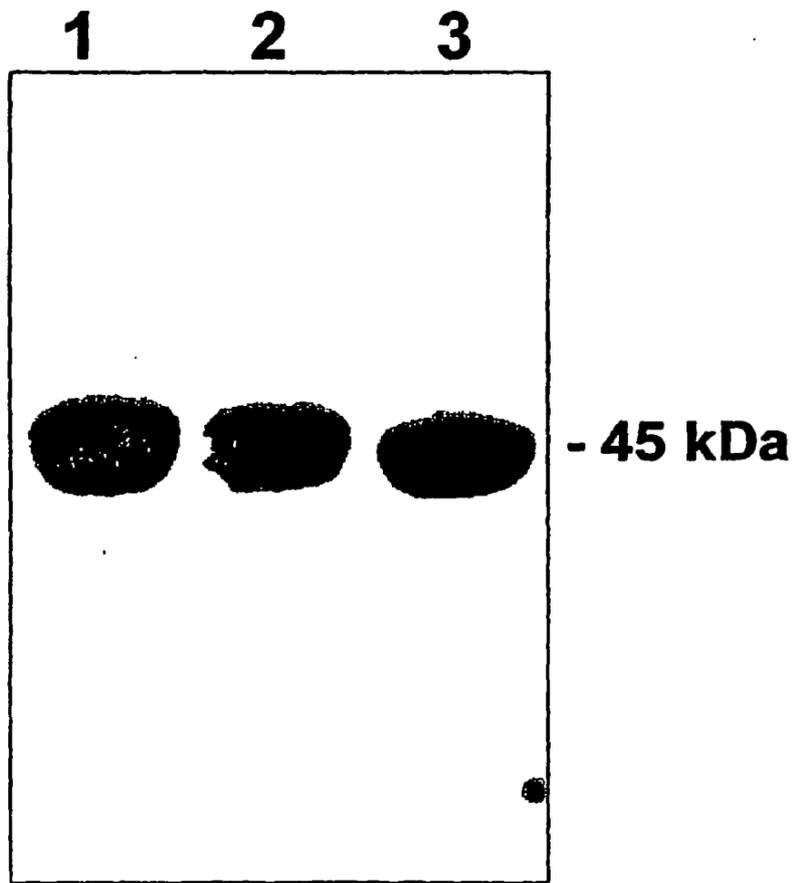


FIG.36

	1	10	20	30	40	50	60	SEC ID Nº
huLYS	MKALIVLGLVLLSVTVQGKVFERCELARTLKRLGMDGYRGISLANWMCLAKWESGYNTRA							575
chkLYS	MRSLILVLCFLPLAALGKVFGRCELAAMKRIHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQA							276
	61	70	80	90	100	110	120	
huLYS	TNYNAGDRSTDYGIFQINSRYWCNDGKTPGAVNACHLSCSALLQDNIADAVACAKRVVRD							
chkLYS	TNRNT-DGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCHIPCSTALLSSDITASVNCACKIVSD							
	121	130	140	148				
huLYS	PQGIRAWVAWRNRCQNRDVRQYVQGGCV							
chkLYS	GNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGRL							

Identidad: 63%

	1	10	20	30	40	50	60	SEC ID Nº
SLLP1	MVSALRGAPLIRVHSSPVSSPSVSGPRRLVSCSSQSSALSQSGGGSTSAAGIEARSRAL							597
huLYS	RRRWCPAGIMLLALVCLLSCLLPSSEAKLYGRCELARVLHDFGLDGYRGYSLADWVCLAY							
	61	70	80	90	100	110	120	
SLLP1	RRRWCPAGIMLLALVCLLSCLLPSSEAKLYGRCELARVLHDFGLDGYRGYSLADWVCLAY							
huLYS	MKALIVLGLVLLSVTVQGKVFERCELARTLKRLGMDGYRGISLANWMCLAK							
	121	130	140	150	160	170	180	
SLLP1	FTSGFNAAALDYEA-DGSTNNGIFQINSRWCSN-LTPNVPNVCRMYCSOLLNPMLKDTV							
huLYS	WESGYNTRATNYNAGDRSTDYGIFQINSRYWCNDGKTPGAVNACHLSCSALLQDNIADAV							
	181	190	200	210	217			
SLLP1	ICAMKITQEPQGLGYWEAWRHHCQKDLTEWVQGGDF							
huLYS	ACAKRVVRDPQGIRAWVAWRNRCQNRDVRQYVQGGCV							

Identidad: 58%

FIG.37

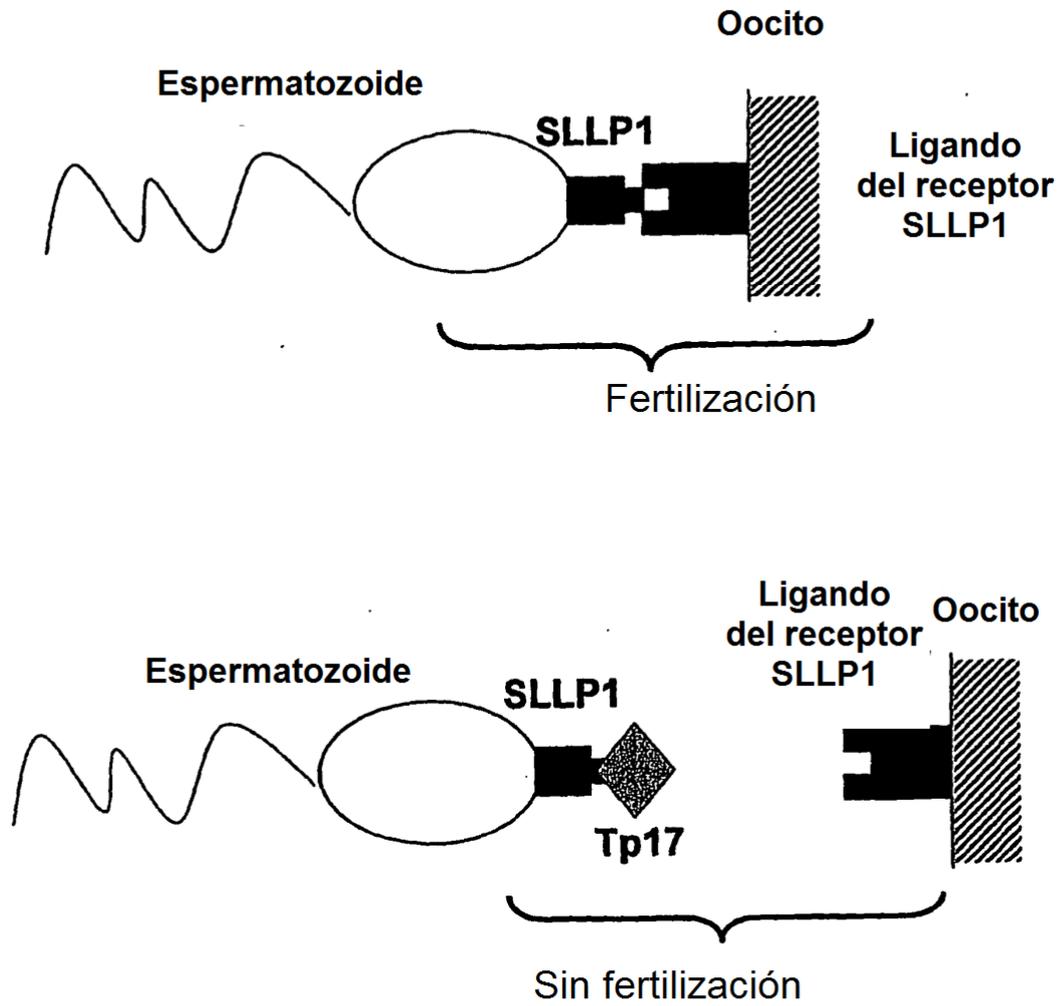


FIG.38

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO declina responsabilidades por este asunto.

Documentos de patentes citadas en la descripción

- US 6300064 B [0074]
- US 5969108 B [0074]
- US 6225047 B [0086]
- US 5719060 A [0088]
- US 5894063 A [0088]
- US 4683195 A [0095]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- CISANI et al. *Microbios.*, 1989, vol. 59, 73-83 [0039] [0127]
- LAMPI et al. *Antivir. Chem. Chemother.*, 2001, vol. 12, 125-131 [0039]
- LEE-HUANG et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 96, 2678-2681 [0039]
- MONCHOIS et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 18437-18441 [0039] [0113] [0132]
- RISLER et al. *J. Mol. Biol.*, 1988, vol. 204, 1019 [0041]
- STEWART et al. *Solid Phase Peptide Synthesis*. WH Freeman Co, 1969 [0053]
- MERRIFIELD. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0053]
- Antibody Engineering. IRL Press, 1996 [0074]
- MUYLDERMANS et al. *J. Biotechnol.*, 2001, vol. 74, 277-302 [0075]
- ANDREOTTI et al. *Biotechniques*, 2003, vol. 35, 850-859 [0078]
- KAISER et al. *Anal. Biochem.*, 1999, vol. 266, 1-8 [0080]
- DAVIES et al. *Biotechniques*, 1999, vol. 27, 1258-61 [0086]
- SHIMIZU et al. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002, vol. 25 (776), 15-30 [0088]
- KIERNAN et al. *Biochem.*, 2002, vol. 301, 49-56 [0088]
- PRAMANIK et al. *Protein Sci.*, 2002, vol. 11, 2676-87 [0088]
- Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0095]
- HOGAN et al. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986 [0095]
- DNA Cloning. 1985, vol. I, II [0095]
- Oligonucleotide Synthesis. 1984 [0095]
- Nucleic Acid Hybridization. 1984 [0095]
- Transcription and Translation. 1984 [0095]
- FRESHNEY. *Culture Of Animal Cells*. Alan R. Liss, Inc, 1987 [0095]
- Immobilized Cells And Enzymes. IRL Press, 1986 [0095]
- A Practical Guide To Molecular Cloning. PERBAL. *Methods In Enzymology*. Academic Press, 1984 [0095]
- Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987 [0095]
- Methods In Enzymology. Academic Press Inc, vol. 154, 155 [0095]
- Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology. Academic Press, 1987 [0095]
- Handbook Of Experimental Immunology. 1986, vol. I-IV [0095]
- AKINS et al. *Infect Immun.*, 1993, vol. 61, 1202-1210 [0099]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0099]
- HSU et al. *Infect. Immun.*, 1989, vol. 57, 196-203 [0107]
- WEIGEL et al. *Infect. Immun.*, 1992, vol. 60, 1568-1576 [0107]
- PETSKO et al. *Protein Structure and Function*. New Science Press Ltd, 2003 [0116]
- MALCOLM et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 133-7 [0117]
- OEVERMANN et al. *Antivir. Res.*, 2003, vol. 59, 23-33 [0127]
- LOWHAGEN et al. *Acta Derm. Venereol.*, 2002, vol. 82, 118-21 [0127]
- BRUISTEN et al. *Curr. Womens Health Report*, vol. 3, 288-98 [0127]
- FERNIE-KING et al. *Infect. Immun.*, 2002, vol. 70, 4908-4916 [0132]
- Passive Haemagglutination With Special Reference to the Tanned Cell Technique. HERBERT et al. *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publications, 1979, vol. 1, 20.1-22.20 [0138]
- STEFEN et al. *J. Exp. Med.*, 1951, vol. 93, 107-120 [0138]
- HIRATA. *J. Immunol.*, 1968, vol. 100, 641-46 [0138]
- SHUGAR et al. *Biochem. Biophys.*, 1952, vol. 8, 302-309 [0142]
- MANDAL et al. *Biol Reprod.*, 2003, vol. 68, 1525-37 [0186]