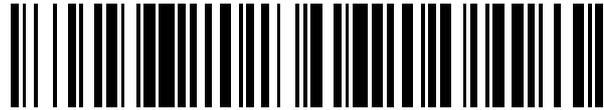


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 462**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/20** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2013 E 13705906 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2804874**

54 Título: **Antígenos TpN47 de Treponema pallidum inmunorreactivos solubles**

30 Prioridad:

**19.01.2012 EP 12000310**

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

**26.02.2016**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FAATZ, ELKE;  
SHAARSCHMIDT, PETER;  
SCHMITT, URBAN y  
SCHOLZ, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 561 462 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**

Antígenos TpN47 de *Treponema pallidum* inmunorreactivos solubles.

## 5 Campo de la invención

La invención se refiere variantes solubles, estables e inmunorreactivas del antígeno 47 (TpN47) de *Treponema pallidum* que comprende al menos los residuos de aminoácidos 63 a 174 (es decir, el dominio B) de la molécula de proteína TpN47 con la condición de que los antígenos carecen de los aminoácidos 224 a 351 (es decir, el dominio C) de TpN47, en donde el antígeno TpN47 está fusionado con una chaperona. La invención se refiere además a un antígeno 47 soluble de *Treponema pallidum* (antígeno TpN47) que comprende los dominios B y D o los dominios A+B y D, también con la condición de que estos antígenos carecen de dominio C. Además, la invención se refiere a un método de producción de estas variantes de TpN47 solubles, estables e inmunorreactivas, así como el uso de estos antígenos en un ensayo de inmunodiagnóstico orientado a la detección de anticuerpos contra *Treponema pallidum* en una muestra aislada.

## Antecedentes de la invención

*Treponema pallidum* pertenece a la familia de bacterias de espiroquetas y es el agente causante de la sífilis. La sífilis, también llamado Lues, se transmite principalmente por contacto sexual. *Treponema pallidum* también puede pasar de la madre al bebé durante el embarazo. La enfermedad se caracteriza por los diferentes estadios clínicos y largos períodos de infección latente, asintomática. Muchas personas no notan los síntomas y por tanto no son conscientes de su infección por sífilis durante años. La infección primaria es limitada y por lo general causa una pequeña úlcera indolora (estadio primario, "Lues I"). Si no se trata con penicilina, la enfermedad pasa al estadio secundario Lues II (cerca de ocho semanas después de la infección), lo que conlleva síntomas parecidos a la gripe, erupciones en la piel que no pica y ganglios linfáticos inflamados. Después de algunos años, en el estadio Lues III, aparecen nodos sifilíticos por todo el cuerpo. El estadio final (Lues IV) se caracteriza por la destrucción del sistema nervioso central llevando eventualmente a trastornos neurológicos y cardiológicos, parálisis general, ataxia, demencia y ceguera.

Aunque las terapias efectivas han estado disponibles desde la introducción de la penicilina en la mitad del siglo 20, la sífilis sigue siendo un importante problema de salud global. Es obligatorio identificar a los pacientes con infección por *Treponema*, para apoyar el tratamiento antibiótico y así prevenir la propagación de la sífilis. Como consecuencia, es necesario proporcionar herramientas de diagnóstico fiables tales como inmunoensayos para la detección de anticuerpos contra *Treponema pallidum*. Sin embargo, con el fin de ser utilizado como compuestos específicos en aplicaciones serológicas, las proteínas recombinantes tienen que cumplir varios requisitos tales como solubilidad, estabilidad y antigenicidad.

Uno de los polipéptidos asociados a la membrana de *Treponema pallidum* (el agente causante de infecciones por sífilis) es TpN47, una gran proteína que consta de 434 residuos de aminoácidos. Se le atribuye a TpN47 inmunodominancia en la respuesta inmune humoral contra *Treponema* (*Folia Microbiol.* (2003) 48 (4), 549-553), y los anticuerpos contra TpN47 se encuentran frecuentemente en sueros de individuos humanos infectados por *Treponema*. Así, una variante antigénica y soluble de TpN47 recombinante, sería un ingrediente valioso para establecer un inmunoensayo para la detección de anticuerpos de *Treponema* que combina la alta sensibilidad y especificidad. En el mejor de los casos, tal antígeno debería permitir la detección de ambas moléculas IgG e IgM.

Las variantes recombinantes de TpN47 se han descrito en la literatura. En el *Journal of Immunology* (1996) 15 de julio; 157 (2): 720-31, Baughn et al. describen sobre una exploración de epítopos, péptidos 12-meros (residuos con solapamiento de 8 aminoácidos, 4 residuos de aminoácidos diferentes) que abarca toda la secuencia de TpN47. Sobre la base de este análisis, los autores describen diez fragmentos TpN47 inmunodominantes, que van desde 9 a 29 residuos de aminoácidos de longitud. También se ha descrito la estructura cristalina y la topología de dominio de TpN47 (*Journal of Biological Chemistry* (2002), 277 (4), 41857-41864, Deka et al.).

Los inmunoensayos para la detección de anticuerpos de *Treponema* son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Rostopira et al. (*Folia Microbiol.* 48 (4), 549-553, 2003) describen un inmunoensayo para el diagnóstico de la sífilis utilizando una combinación de antígenos de TPN 17 y antígenos de TpN47, identificando TpN47 como uno de los antígenos inmunodominantes. En esta publicación de longitud completa de TpN47 se utilizó como antígeno.

Se produjo en exceso una variante de longitud completa de TpN47 en una *E. coli* huésped (BL21 / DE3) y se tuvo éxito en la preparación del antígeno de TpN47 hasta la homogeneidad. Sin embargo, nuestros experimentos iniciales con la versión completa de TpN47 inequívocamente revelaron que esta proteína tiende a agregarse a temperaturas superiores a 35 °C. A pesar de la fusión de fusiones de chaperonas en tándem como EcSlyD-EcSlyD o incluso EcSlpA-EcSlpA (más termoestable), TpN47 de longitud completa agrega inevitablemente en una asociación de alto peso molecular a temperaturas superiores a 35 °C. Desde que se conoce *Treponema pallidum* como un patógeno sensible a temperatura, el hallazgo de que una de sus principales proteínas de membrana comparte sensibilidad a la temperatura puede no parecer demasiado sorprendente. De todos modos, los procesos de

agregación inducidos térmicamente de ingredientes proteínicos en inmunoensayos normalmente resultan, bien en una pérdida de señal o en una pérdida de especificidad. Por lo tanto, el hecho de que TpN47 de longitud completa (incluso en fusión con chaperonas que aumentan la solubilidad tales como SlyD o SIpA) tiende a agregarse incluso a temperaturas moderadamente elevadas (> 35 °C), excluye claramente a esta molécula de aplicaciones simples y directas en un inmunoensayo sensible con formato DAGS.

A pesar del conocimiento estructural detallado sobre TpN47 (Deka et al. Journal of Biological Chemistry (2002), 277 (4), 41857 - 41864), la técnica anterior no describe el termolabilidad pronunciada de TpN47 ni describe las variantes de antígeno TpN47 que superan el problema de la agregación inducida térmicamente y la pérdida concomitante de la sensibilidad en inmunoensayos destinados a la detección de anticuerpos contra *Treponema pallidum* en una muestra.

Guo et al. (Xiamen Daxue Xuebao -Ziran Kexue Ban (2008), 47 (6), 874 - 878) describen mutantes truncados N- o C-terminales solubles específicos de TpN47 que se expresan de forma recombinante en *E. coli*. Sin embargo, el problema de la inestabilidad térmica y la tendencia a la agregación de la proteína de longitud completa TpN47 no se aborda. Además, los datos de Guo et al. sugieren que una combinación de los dominios C y D (C190) de TpN47 casi iguala la antigenicidad de la proteína TpN47 de longitud completa.

El problema de la estabilidad ha sido resuelto en la presente invención mediante la generación de variantes solubles, estables e inmunorreactivas del antígeno 47 de *Treponema pallidum* (antígeno TpN47) que comprenden al menos el dominio B (aa 63-174) de la molécula de proteína TpN47 con la condición de que los antígenos carecen de dominio C (aa 224-351) de TpN47, en donde el antígeno TpN47 está fusionado con una chaperona.

Otra solución de este problema es un antígeno soluble que comprende los dominios B y D de TpN47 (aa 63 a 174 y 352 a 434 de Id. de Sec. N° 1) o un antígeno que comprende los dominios TpN47 A+B y D (aa 26 a 223 y 352 a 434 de Id. de Sec. N° 1). Ambas variantes carecen del dominio C de TpN47.

#### Resumen de la invención

La invención se refiere a antígenos solubles de *Treponema pallidum*, es decir, a antígenos de TpN47 que comprenden al menos el dominio B (los residuos de aminoácidos 63 a 174 de Id. de Sec. N° 1) o por lo menos los residuos de los dominios A+B (aminoácidos 26 a 223 de Id. de Sec. N° 1) con la condición de que el antígeno TpN47 carece del dominio C (residuos de aminoácidos 224 a 351 de Id. de Sec. N° 1), en donde el antígeno TpN47 se fusiona con una chaperona. La invención se refiere también a soluble antígenos TpN47 que comprenden al menos el dominio B (residuos de aminoácidos 63 a 174 de Id. de Sec. N° 1) y el dominio D (residuos de aminoácidos 352 a 434 de Id. de Sec. N° 1), o dominios A+B (residuos de aminoácido 26 a 223 de Id. de Sec. N° 1) y el dominio D (residuos de aminoácidos 352 a 434 de Id. de Sec. N° 1) con la condición de que estos antígenos también carecen del dominio C (residuos de aminoácidos 224-351 de Id. de Sec. N° 1). Estos antígenos pueden fusionarse con una chaperona o a otro compañero de fusión con el fin de aumentar aún más su solubilidad.

La invención se refiere además a moléculas de DNA recombinante que codifica dicho antígeno TpN47 y también se refiere a un vector de expresión que contiene operativamente unido o integrado el DNA anteriormente descrito que codifica un antígeno TpN47. La invención también se refiere a una célula huésped transformada con dicho vector de expresión y también un método de producción de dicho antígeno TpN47.

Además, la invención se refiere a métodos de diagnóstico in vitro para la detección de la sífilis, es decir, a un método de detección de anticuerpos contra TpN47 usando dichas variantes de antígeno TpN47 y también se refiere a un equipo de ensayo de reactivos que comprende un antígeno TpN47 de acuerdo con la invención. La invención también se refiere a una composición de al menos dos antígenos de *Treponema pallidum* que comprende, por ejemplo, un antígeno TpN47 y un antígeno TpN17 o TpN15. En otra realización dicha composición comprende un antígeno TpN47 y ambos antígenos TpN17 y TpN15. Adicionalmente, la invención se refiere a un método de producción de estos antígenos, así como el uso de estos antígenos en un ensayo de inmunodiagnóstico para la detección de anticuerpos contra *Treponema pallidum* en una muestra aislada.

#### Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 a 6 muestran los perfiles analíticos de filtración en gel de diferentes construcciones de dominio EcSlyD-EcSlyD-TpN47 en una columna Superdex 200 HR 10/30, véase también el ejemplo 5. Se aplicó una cantidad aproximada de 200 µl de una solución de proteína de 1,3 mg/ml (proteína de fusión disuelta en fosfato de potasio 150 mM a pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM) en la columna SEC, y la elución se monitorizó a 280 nm a una velocidad de flujo de 0,8 ml / min. El estándar FPLC (línea punteada de color gris claro) contiene beta-galactosidasa (465.000 Da), IgG de oveja (150.000 Da), fragmento Fab de IgG de oveja (50.000 Da), mioglobina de caballo (17.000 Da) y el dipéptido glicina-tirosina (238 Da).

Todas las construcciones de proteína se sometieron a temperaturas elevadas (35° C, 40° C) en una incubación durante la noche (18 h) bajo concentraciones de tampón idénticas (fosfato potásico 150 mM pH 8,0, KCl 100 mM,

EDTA 0,5 mM) a una concentración de 1,3 mg/ml, equivalente a una concentración molar de 15,2  $\mu\text{M}$  - 26,5  $\mu\text{M}$ . Después de estrés térmico, las muestras de proteína se sometieron a centrifugación y luego se analizaron por su tendencia a agregarse mediante análisis FPLC como se ha descrito anteriormente.

5 La Figura 1 presenta la termoestabilidad de EcSlyD-EcSlyD-TpN47/AB (26 a 223) tal como se analizó mediante análisis de filtración en gel en una columna Superdex 200. Se aplicaron 230  $\mu\text{l}$  a la columna, que corresponde a 300  $\mu\text{g}$  de proteína. Los perfiles de elución de TpN47/AB después de la incubación a 4  $^{\circ}\text{C}$ , 35  $^{\circ}\text{C}$  y 40  $^{\circ}\text{C}$  coinciden muy bien. No hay ningún indicio a la agregación o procesos de asociación. Los perfiles de elución tal como se comprueba por absorción a 280 nm apuntan a un fragmento de proteína soluble TpN47/AB incluso a temperaturas elevadas  
10 tales como 40  $^{\circ}\text{C}$ .

La Figura 2 muestra la termoestabilidad de EcSlyD-EcSlyD-TpN47/B (63 a 174) tal como se analizó mediante análisis de filtración en gel en una columna Superdex 200. Se aplicaron 270  $\mu\text{l}$  a la columna, que corresponde a 350  $\mu\text{g}$  de proteína. Los perfiles de elución de TpN47/B después de la incubación a 4  $^{\circ}\text{C}$ , 35  $^{\circ}\text{C}$  y 40  $^{\circ}\text{C}$  coinciden casi perfectamente. No hay ningún indicio a la agregación o procesos de asociación. Los perfiles de elución tal como se comprueba por la absorción a 280 nm proporcionan pruebas convincentes de que el fragmento de proteína TpN47/B es soluble y estable incluso a temperaturas elevadas tales como 40  $^{\circ}\text{C}$ .

La Figura 3 ilustra la termoestabilidad de EcSlyD-EcSlyD-TpN47/C (224 a 351) tal como se analizó mediante análisis de filtración en gel en una columna Superdex 200. Se aplicaron 154  $\mu\text{l}$  a la columna, que corresponde a 200  $\mu\text{g}$  de proteína. Los perfiles de elución de TpN47/C después de la incubación a 4  $^{\circ}\text{C}$  y 35  $^{\circ}\text{C}$  coinciden casi perfectamente. Sin embargo, incluso a 35  $^{\circ}\text{C}$ , una porción muy pequeña de TpN47 C eluye en el volumen vacío de la columna de filtración en gel (línea continua gris oscuro), que apunta a la aparición de procesos de agregación. Después de la incubación a 40  $^{\circ}\text{C}$ , casi un tercio de la proteína de fusión eluye en el volumen vacío de la columna SEC, indicativo de la formación de grandes partículas de proteína agregadas. Se hace evidente de la figura 3 que el dominio C de TpN47 posee una tendencia sustancial a agregarse a temperaturas superiores a 35  $^{\circ}\text{C}$ .

La Figura 4 muestra la termoestabilidad de EcSlyD-EcSlyD-TpN47/CD (224-434) tal como se analizó mediante análisis de filtración en gel en una columna Superdex 200. Se aplicaron 195  $\mu\text{l}$  a la columna, que corresponde a 250  $\mu\text{g}$  de proteína. El perfil de elución de TpN47/CD después de la incubación a 4  $^{\circ}\text{C}$  presenta un bonito pico simétrico, indicativo de una proteína soluble y homogénea. Cuando se incubaba a 35  $^{\circ}\text{C}$ , EcSlyD-EcSlyD-TpN47/CD está formando grandes partículas de proteína agregadas, como se observa por el perfil correspondiente, que muestra una gran porción de la proteína eluyendo en el volumen vacío de la columna SEC (línea continua gris oscuro). Después de la incubación a 40  $^{\circ}\text{C}$ , la mayor parte de la proteína de fusión de CD eluye en el volumen vacío de la columna de filtración en gel (línea negra continua). Es obvio a partir de la figura 4 que la parte C-terminal de TpN47, a saber, la proteína CD de fusión, posee una alta tendencia intrínseca a agregarse incluso a una temperatura moderadamente elevada tal como 35  $^{\circ}\text{C}$ .

La Figura 5 ilustra la termoestabilidad de EcSlyD-EcSlyD-TpN47/D (352 a 434) tal como se analizó mediante análisis de filtración en gel en una columna Superdex 200. Se aplicaron 331  $\mu\text{l}$  a la columna, que corresponde a 430  $\mu\text{g}$  de proteína. Los perfiles de elución de TpN47/D después de la incubación a 4  $^{\circ}\text{C}$ , 35  $^{\circ}\text{C}$  y 40  $^{\circ}\text{C}$  son casi indistinguibles y coinciden perfectamente. No hay indicio alguno a los procesos de agregación o asociación. Los perfiles de elución tal como se comprueba por la absorción a 280 nm proporcionan pruebas convincentes de que el fragmento de proteína TpN47/D es perfectamente soluble y estable incluso a temperaturas elevadas tales como 40  $^{\circ}\text{C}$ .

La Figura 6 muestra la termoestabilidad de la variante de TpN47 de longitud completa EcSlyD-EcSlyD-TpN47/ABCD (21 - 434) tal como se analizó mediante análisis de filtración en gel en una columna Superdex 200. Se aplicaron 90  $\mu\text{l}$  a la columna, que corresponde a 117  $\mu\text{g}$  de proteína. El perfil de elución de TpN47/ABCD después de la incubación a 4  $^{\circ}\text{C}$  presenta un buen pico en un volumen de elución de 13,5 ml, indicativos de una proteína soluble y homogénea. Cuando se incubaba a 35  $^{\circ}\text{C}$ , EcSlyD-EcSlyD-TpN47/ABCD está formando partículas grandes de proteínas agregadas, a juzgar por el perfil correspondiente, que muestra más de 66% de la proteína de elución en el volumen vacío de la columna SEC (línea continua gris oscuro). Después de la incubación a 40  $^{\circ}\text{C}$ , casi el 96% de TpN47 de longitud completa eluye en el volumen vacío de la columna de filtración en gel (línea de color negro continuo). Es obvio a partir de la figura 6 que el TpN47 de longitud completa posee una tremenda tendencia intrínseca a agregarse incluso a una temperatura moderadamente elevada tal como 35  $^{\circ}\text{C}$ . Debido a la escasez de proteína de longitud completa, solamente se aplicaron 117  $\mu\text{g}$  de EcSlyD-EcSlyD sobre la columna de Superdex (que conduce a una señal de absorción menor), que es sólo una cantidad fraccionaria cuando se compara con las otras variantes de TpN47. La evaluación de la tensión térmica, sin embargo, se llevó a cabo bajo condiciones idénticas para cada variante de TpN47.

La Figura 7 muestra nuestra estrategia de mapeo de epítomos de células B en la búsqueda de variantes de antígenos inmunodominantes TpN47. En la parte superior: TpN47 de longitud completa (21-434, que comprende los dominios ABCD) con EcSlyD-EcSlyD fusionado al N terminal de TpN47. Sección media: fragmentos de polipéptidos TpN47 individuales (fusión para EcSlyD no se muestra), en orden descendente: fragmentos de polipéptidos de TpN47 30-66, 106-132, 137-170, 197-219, 225-250, 273-296, 321-362, 368-388, 391-434 de acuerdo con Id. de Sec.

Nº 8-16; los resultados experimentales para la inmunorreactividad de estos péptidos de acuerdo con el Ejemplo 4 se muestran en la tabla 2 (Figura 8a-c). Parte inferior: localización de los dominios B, AB, C, D y CD de TpN47 (fusión a EcSlyDEcSlyD no se muestra) con respecto a TpN47 de longitud completa; los resultados experimentales para la inmunorreactividad (es decir, antigenicidad) de estas variantes de fusión de TpN47 de acuerdo con el ejemplo 4 se muestran en la tabla 3 (Figura 9).

La Figura 8a-c muestra la tabla 2, que contiene los resultados obtenidos en el ejemplo 4: reactividad inmunológica de fragmentos cortos de TpN47 (lineales) no estructurados fusionados a la chaperona EcSlyD. Los inmunoensayos se llevaron a cabo mediante el uso de un analizador Elecsys® 2010. La dinámica de la señal está normalizada con respecto al valor medio obtenido para las muestras negativas de Treponema. Los sueros de Treponema positivos fueron adquiridos de Boca Biolistics (Coconut Creek, FL, EE.UU.), los controles Treponema-negativos fueron los donantes de sangre internos. A tener en cuenta que la columna de la derecha (experimento 10, TpN47 de longitud completa) es idéntico en cada una de las figuras 8a, b y c, respectivamente.

La Figura 9 muestra la tabla 3, que contiene los resultados obtenidos en el ejemplo 4: reactividad inmunológica (es decir, antigenicidad) de fragmentos grandes de TpN47 (dominios) fusionados a EcSlyD-EcSlyD chaperona en tándem. Los inmunoensayos se llevaron a cabo mediante el uso de un analizador Elecsys® 2010. La dinámica de la señal (SD) está normalizada con respecto al valor medio obtenido para las muestras negativas de Treponema. Los sueros de Treponema positivos fueron adquiridos de Boca Biolistics (Coconut Creek, FL, EE.UU.), los controles negativos fueron los donantes de sangre internos.

La figura 10 muestra la tabla 4: antigenicidad residual de TpN47 dominios AB (26-223) y B (63-174), después de estrés térmico (72h a 42 °C). Ambos dominios AB y el dominio B se fusionaron con el módulo de chaperona en tándem potenciador de la solubilidad EcSlyD-EcSlyD según lo descrito. Los inmunoensayos se llevaron a cabo mediante el uso de un analizador Elecsys® 2010. La dinámica de la señal (SD) está normalizada con respecto al valor medio obtenido para las muestras negativas de Treponema. Los sueros de Treponema positivos fueron adquiridos de SeraCare (MA, EE.UU.), los controles negativos de Treponema fueron adquiridos de Trina Bioreactives AG (Nänikon, Suiza).

La figura 11 muestra la tabla 5: antigenicidad residual de TpN47 dominios C (224-351) y D (352-434), después de estrés térmico (72h a 42 °C). Tanto dominio C y D se fusionaron con el módulo de chaperona tándem EcSlyDEcSlyD potenciadores de la solubilidad como se describe. Los inmunoensayos se llevaron a cabo mediante el uso de un analizador Elecsys® 2010. La dinámica de la señal (SD) está normalizada con respecto al valor medio obtenido para las muestras negativas de Treponema. Los sueros de Treponema positivos fueron adquiridos de SeraCare (MA, EE.UU.), los controles negativos de Treponema fueron adquiridos de Trina Bioreactives AG (Nänikon, Suiza).

La figura 12 muestra la tabla 6: antigenicidad residual de TpN47 / CD (224-434) y de larga duración TpN47 (21-434), después de estrés térmico (72h a 42 °C). Tanto CD dominios y de larga duración TpN47 se fusionaron con el módulo acompañante tándem solubilidad mejoran EcSlyD-EcSlyD según lo descrito. Los inmunoensayos se llevaron a cabo mediante el uso de un analizador Elecsys® 2010. La dinámica de la señal (SD) está normalizada con respecto al valor medio obtenido para las muestras negativas de Treponema. Los sueros de Treponema positivos fueron adquiridos de SeraCare (MA, EE.UU.), los controles negativos de Treponema fueron adquiridos de Trina Bioreactives AG (Nanikon, Suiza).

Tal como se detalla en la lista de secuencias las siguientes secuencias de proteínas se utilizan en esta especificación:

Id. de Sec. Nº 1 muestra TpN47 de longitud completa fusionado a dos moléculas SlyD de E. coli:

EcSlyD-EcSlyD-TpN47 (aa 21-434 TpN47 de Swiss Prot P29723 están subrayados); en la posición 315, una cisteína se ha sustituido por alanina, y para los propósitos de purificación se ha añadido una cola de hexa-histidina al extremo C-terminal.

**MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFPDV  
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD  
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGGSGG**

SGGGSGGGKV AKDLVVS LAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE  
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE  
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGGG  
 GGGSGGGSGG GSGGGGSSH ETHYGYATLS YADYWAGELG QSRDVL LAGN AADRAGDLD  
AGMFDVSR THGHAFRQQ FQYAVEVLGE KVLSKQETED SRGRKKWEYE TDPSVTKMVR  
ASASFQDLGE DGEIKFEAVE GAVALADRAS SFMVDSEEYK ITNVKVHGMK FVPVAVPHEL  
KGIAKEKFHF VEDSRVTENT NGLKTMLTED SFSARKVSSM ESPHDLVVD VGTGYHSRFG  
SDAEASVMLK RADGSELHR EFIDYVMNFN TVRYDYGGDD ASYTNLMASY GTKHSADSWW  
KTGRVPRISA GINYGFDRFK GSGPGYYRLT LIANGYRDVV ADVRF LPKYE GNIDIGLKGK  
VTIGGADAE TLMDAAVDVF ADGQPKLVSD QAVSLGQNVL SADFTPGTEY TVEVRFKEFG  
SVRAKVVAQL EHHHHHH

Id. de Sec. Nº 2 muestra los dominios AB de TpN47 fusionado a dos moléculas SlyD de E. coli:

- 5 EcSlyD-EcSlyD-TpN47/AB (aa 26-223 de TpN47 de Swiss Prot P29723 están subrayados); para los propósitos de purificación se ha añadido una cola de hexa-histidina al extremo C-terminal.

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV  
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVF MGVD EL QVGMFLAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD  
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG  
 SGGGSGGGKV AKDLVVS LAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE  
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE  
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGGG  
 GGGSGGGSGG GSGGGETHYG YATLSYADYW AGELGQSRDV LLAGNAEADR AGDL DAGMFD  
AVSRAHGHGA FRQFQYAVE VLGEKVL SKQ ETEDSRGRKK WEYETDPSVT KMVRASASFQ  
DLGEDGEIKF EAVEGAVALA DRASSFMVDS EYKITNVKV HGMKFV PVAV PHLKGIAKE  
KHFVEDSRV TENTNGLKTM LTEDSFSARK VSLEHHHHHH

- 10 Id. de Sec. Nº 3 muestra el dominio B de TpN47 fusionado a dos moléculas SlyD de E. coli:

EcSlyD-EcSlyD-TpN47/B (aa 63-174 de TpN47 de Swiss Prot P29723 están subrayados); para los propósitos de purificación se ha añadido una cola de hexa-histidina al extremo C-terminal.

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV  
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVF MGVD EL QVGMFLAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD  
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG  
 SGGGSGGGKV AKDLVVS LAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE  
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE  
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGGG  
 GGGSGGGSGG GSGGGDL DAG MFDAVSRATH GHGAFRQQFQ YAVEVLGEKV LSKQETEDSR  
GRKKWEYETD PSVTKMVRAS ASFQDLGEDG EIKFEAVEGA VALADRASSF MVDSEEYKIT  
NVKVHGMLEH HHHHH

- 15 Id. de Sec. Nº 4 muestra el dominio C de TpN47 fusionado a dos moléculas SlyD de E. coli: EcSlyD-EcSlyD-TpN47/C (aa 224-351 TpN47 de Swiss Prot P29723 están subrayados); en la posición 315, una cisteína se ha sustituido por alanina y para los propósitos de purificación se ha añadido una cola de hexa-histidina al extremo C-terminal.
- 20

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV  
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFVGMVDEL QVGMFLAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD  
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGGSGGG  
 SGGGSGGGKV AKDLVVS LAY QVRTEDGVLV DESPVSA PLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE  
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE  
 DDHVVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGGS  
 GGGSGGSGGG GSGGGSMESP HDLVVDTVGT GYHSRFGSDA EASVMLKRAD GSELSHREFI  
DYVMNFNTVR YDYYGDDASY TNLMASYGTK HSADSWWKTG RVPRISAGIN YGFDRFKGSG  
PGYYRLTLIA NGYRDVVADV RFLLEHHHH H

Id. de Sec. Nº 5 muestra los dominios CD de TpN47 fusionados a dos moléculas SlyD de E. coli:

- 5 EcSlyD-EcSlyD-TpN47/CD (aa 224-434 TpN47 de Swiss Prot P29723); en la posición 315, una cisteína se ha sustituido por alanina, y para los propósitos de purificación se ha añadido una cola de hexa-histidina al extremo C-terminal.

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV  
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFVGMVDEL QVGMFLAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD  
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGGSGGG  
 SGGGSGGGKV AKDLVVS LAY QVRTEDGVLV DESPVSA PLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE  
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE  
 DDHVVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGGS  
 GGGSGGSGGG GSGGGSMESP HDLVVDTVGT GYHSRFGSDA EASVMLKRAD GSELSHREFI  
DYVMNFNTVR YDYYGDDASY TNLMASYGTK HSADSWWKTG RVPRISAGIN YGFDRFKGSG  
PGYYRLTLIA NGYRDVVADV RFLPKYEGNI DIGLKGKVL IGGADAETLM DAAVDVDFADG  
QPKLVSDQAV SLGQNVLSAD FTPGTEYTVE VRFKEFGSVR AKVVAQLEHH HHHH

10

Id. de Sec. Nº 6 muestra el dominio D de TpN47 fusionado a dos moléculas SlyD de E. coli:

EcSlyD-EcSlyD-TpN47/D (aa 352-434 TpN47 Prot P29723 de Swiss)

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV  
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFVGMVDEL QVGMFLAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD  
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGGSGGG  
 SGGGSGGGKV AKDLVVS LAY QVRTEDGVLV DESPVSA PLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE  
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE  
 DDHVVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGGS  
 GGGSGGSGGG GSGGGPKYEG NIDIGLKGKV LTIGGADAET LMDAAVDVFA DGQPKLVSDQ  
AVSLGQNVLS ADFTPGTEYT VEVRFKEFGS VRAKVVAQLE HHHHHH

15

Id. de Sec. Nº 7 muestra la secuencia enlazante (GGGS)<sub>5</sub>GGG descrita en el ejemplo 1. La secuencia enlazante flexible rica en glicina se inserta entre las dos moléculas SlyD de E. coli y también entre SlyD y el antígeno de TpN47 GGGSGGSGGG GSGGGSGGGS GGG

20

Id. de Sec. Nº 8 muestra el péptido de TpN47 EcSlyD-TpN47/p02-1, aminoácidos 30-66 de la secuencia de antígeno 47 de Treponema pallidum de acuerdo con Swiss Prot P29723:

GYATLSYADY WAGELGQSRD VLLAGNAEAD RAGDLDA

25

Id. de Sec. Nº 9 muestra el péptido de TpN47 EcSlyD-TpN47/p03-1, los aminoácidos 106-132 de la secuencia de antígeno 47 de Treponema pallidum de acuerdo con Swiss Prot P29723:

SRGRKKWEYE TDPSVTKMVR ASASFQD

30

Id. de Sec. N° 10 muestra el péptido de TpN47 EcSlyD-TpN47/ p04-1, aminoácidos 137-170 de la secuencia de antígeno 47 de *Treponema pallidum* de acuerdo con Swiss Prot P29723:

5 GEIKFEAVEG AVALADRASS FMVDSEELYKI TNVK

Id. de Sec. N° 11 muestra el péptido de TpN47 EcSlyD-TpN47 / ácidos p05-1, aminoácidos 197-219 de la secuencia de antígeno 47 de *Treponema pallidum* de acuerdo con Swiss Prot P29723:

10 EDSRVTENTN GLKTMLTEDS FSA

Id. de Sec. N° 12 muestra el péptido de TpN47 EcSlyD-TpN47/p06-1, aminoácidos 225-250 de la secuencia de antígeno 47 de *Treponema pallidum* de acuerdo con Swiss Prot P29723:

15 MESPHDLVVD TVGTGYHSRF GSDAEA

Id. de Sec. N° 13 muestra el péptido de TpN47 EcSlyD-TpN47/p07-1, los aminoácidos 273-296 de la secuencia de antígeno 47 de *Treponema pallidum* según Swiss Prot P29723:

20 NFNTVRYDYY GDDASYTNLM ASYG

Id. de Sec. N° 14 muestra el péptido de TpN47 EcSlyD-TpN47/p08-1, los aminoácidos 321-362 de la secuencia de antígeno 47 de *Treponema pallidum* de acuerdo con Swiss Prot P29723:

25 FDRFKGSGPG YYRLTLIANG YRDVVADVRF LPKYEGNIDI GL

Id. de Sec. N° 15 muestra el péptido de TpN47 EcSlyD-TpN47/p09-1, aminoácidos 368-388 de la secuencia de antígeno 47 de *Treponema pallidum* de acuerdo con Swiss Prot P29723:

30 TIGGADAETL MDAAVDVFAD G

Id. de Sec. N° 16 muestra el péptido de TpN47 EcSlyD-TpN47/P10-1, aminoácidos 391-434 de la secuencia de antígeno 47 de *Treponema pallidum* de acuerdo con Swiss Prot P29723:

35 KLVSDQAVSL GQNVLADFT PGTEYTVEVR FKEFGSVRAK VVAQ

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a antígenos solubles de *Treponema pallidum*, más precisamente a variantes solubles del antígeno TpN47 de *Treponema*. Los antígenos TpN47 de acuerdo con la invención carecen del dominio C (residuos de aminoácidos 224 a 351 del Id. de Sec. N° 1) y son ambos estables e inmunorreactivos en un inmunoensayo de diagnóstico *in vitro*.

Se lograron purificar a homogeneidad TpN47 de longitud completa a partir de células huésped procariotas transformadas. Nuestros experimentos iniciales con la versión de longitud completa de TpN47 revelaron claramente que esta proteína tiende a agregarse cuando se expone a temperaturas moderadamente elevadas. TpN47 de longitud completa agrega inevitablemente en un asociado de alto peso molecular a temperaturas superiores a 35 °C, a pesar de la fusión de fusiones en tándem de chaperonas altamente solubilizantes tales como EcSlyD-EcSlyD o incluso (más termoestable) EcSlpA-EcSlpA al antígeno de longitud completa. Con el fin de resolver los problemas de estabilidad que plantea TpN47 de longitud completa, hemos clonado y sobreproducido fragmentos cortos de TpN47 como proteínas de fusión de chaperonas en *E. coli*, purificado los fragmentos a homogeneidad (a juzgar por geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie) y analizados por su correspondiente antigenicidad. En resumen, este enfoque fue un completo fracaso. Para nuestra sorpresa, sólo uno de los diez fragmentos mostraron una antigenicidad significativa (aunque bastante pobre) (véase el cuadro 2 / Fig. 8a, TpN47 30-66). El resto de los fragmentos cortos TpN47 prometedores no eran activos en absoluto. Este hallazgo fue sorprendente en desacuerdo con los datos de la literatura proporcionados en Baughn et al., *J. Immunol.* (1996) 157 (2), 720-731. Como consecuencia, tuvimos que buscar otra manera de eludir la agregación inducida térmicamente de los TpN47 de longitud completa.

En lugar de centrarnos en fragmentos cortos y presumiblemente fragmentos peptídicos no estructurados de TpN47, hemos tratado de diseñar partes conformacionalmente plegadas de TpN47. En el *Journal of Biological Chemistry* (2002), 277 (4), 41857-41864, Deka et al. presentan la estructura cristalina de TpN47 y describen la topología del dominio de esta proteína. Según este trabajo, TpN47 consiste en cuatro dominios, es decir, TpN47 comprende cuatro unidades plegables autónomas. Sin embargo, Deka et al. guardan silencio con respecto a las características inmunológicas de los dominios identificados.

65 Sorprendentemente, hemos sido capaces de expresar con éxito los dominios TpN47 y combinaciones de dominio AB, B, C, CD y D en un huésped *E. coli*. En una realización de la invención, los antígenos TpN47 se produjeron en

fusión con módulos de chaperonas tales como SlyD, FkpA, SlpA y Skp. Todas estas construcciones se purificaron a homogeneidad y se analizaron por su antigenicidad con sueros anti-Sífilis humano en un analizador automático Elecsys. El resultado fue bastante claro: la antigenicidad era bastante alta y aumentó en el orden  $C < D < CD < B < AB$ . Curiosamente, el dominio C podría ser identificado como precario en ensayos de estrés por temperatura (el dominio C y el dominio combinado CD agregaron fuertemente tras la incubación a temperaturas  $> 35^{\circ}\text{C}$ , mientras que AB, B y D permanecieron perfectamente solubles). Brevemente, AB, B y D fueron identificados como fragmentos de TpN47 con una antigenicidad ligeramente reducida pero mejoraron notablemente la solubilidad en comparación con TpN47 de longitud completa. Por lo tanto, los datos de nuestros experimentos de diseño proporcionan pruebas convincentes de que las variantes de TpN47 que carecen del dominio C mejoran significativamente con respecto a la solubilidad y la estabilidad.

En una realización de la invención, el antígeno comprende por lo tanto el dominio B del antígeno *Treponema pallidum* 47 (TpN47) y carece de dominio C de TpN47, es decir, la invención se refiere a un soluble *pallidum* antígeno *Treponema* 47 (antígeno TpN47) que comprende residuos de aminoácidos 63-174 (dominio B) del Id. de Sec. N° 1 con la condición de que dicho antígeno carece de los residuos de aminoácidos 224-351 (dominio C) de Id. de Sec. N° 1 y en donde el antígeno TpN47 se fusiona con una chaperona.

Otra realización adicional de la invención es un antígeno de TpN47 que comprende los dominios A y B y carece del dominio C. Esto significa que la invención cubre un antígeno de TpN47 soluble que comprende los residuos de aminoácidos 26 a 223 (dominio A + B) de Id. de Sec. N° 1 con la condición de que dicho antígeno carece de los residuos de aminoácidos 224-351 (dominio C) de Id. de Sec. N° 1. En una realización adicional, el antígeno TpN47 comprende el dominio B o los dominios A+B, en el que dominio D es una parte adicional del antígeno TpN47. Sin embargo, también en estas realizaciones el dominio C no está. El dominio D comprende los residuos de aminoácidos 352 a 434 de Id. de Sec. N° 1. También en estas realizaciones el antígeno TpN47 se fusiona con una chaperona.

Una realización adicional se refiere a un antígeno 47 soluble de *Treponema pallidum* (antígeno TpN47) que comprende los residuos de aminoácidos 63 a 174 (dominio B) de Id. de Sec. N° 1 con la condición de que dicho antígeno carece de los residuos de aminoácidos 224-351 (dominio C) de Id. de Sec. N° 1, que comprende adicionalmente los residuos de aminoácidos 352-434 del Id. de Sec. N° 1 (dominio D).

Una realización adicional se refiere a un antígeno 47 soluble de *Treponema pallidum* (antígeno TpN47) que comprende los residuos de aminoácidos 26 a 223 (dominio A+B) del Id. de Sec. N° 1 con la condición de que dicho antígeno carece de los residuos de aminoácidos 224-351 (dominio C) de Id. de Sec. N° 1, que comprende adicionalmente los residuos de aminoácidos 352-434 del Id. de Sec. N° 1 (dominio D).

De acuerdo con la invención, el término *Treponema* es la forma abreviada de la expresión completa para el organismo *Treponema pallidum* - el patógeno que causa la sífilis - y ambos términos se pueden utilizar indistintamente.

Un "antígeno TpN47" es una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos de TpN47 que es adecuada como un antígeno para su uso en un ensayo inmunológico. Esto significa que los antígenos de acuerdo con la invención son solubles en condiciones fisiológicas de pH, por ejemplo en un sistema de tampón fosfato a temperatura ambiente sin adición de detergentes. Los antígenos también son capaces de unirse a, o ser reconocidos y unidos por anticuerpos específicos para TpN47, como por ejemplo, anticuerpos anti-TpN47 presentes en una muestra aislada tales como suero humano.

De acuerdo con la invención también se incluyen las variantes de los antígenos de TpN47. El término "variantes" en este contexto se refiere a una proteína o un fragmento de proteína (es decir, un polipéptido o péptido) sustancialmente similar a dicha proteína. En particular, una variante puede ser una isoforma que muestra intercambios de aminoácidos, deleciones o inserciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la isoforma de proteína más prevalente. En una realización, una proteína sustancialmente similar tiene una similitud de secuencia con la isoforma más prevalente de la proteína de al menos el 80%, en otra realización al menos el 85% o al menos el 90%, en otra realización al menos el 95%. El término "variante" también se refiere a una proteína modificada después de la traducción tal como una proteína glicosilada o fosforilada. De acuerdo con la invención, una variante clasificada como una variante del antígeno TpN47, siempre y cuando se mantenga la inmunorreactividad en un inmunoensayo de diagnóstico in vitro, es decir, la variante es todavía capaz de unirse y detectar anticuerpos anti-TpN47 presentes en una muestra. Una "variante" es también una proteína o antígeno que ha sido modificado, por ejemplo por unión covalente o no covalente de una porción marcada o vehículo de la proteína o antígeno. Los posibles marcajes posibles son marcajes radiactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, electroquimioluminiscentes, enzimas u otros, por ejemplo como digoxigenina o biotina. Estos marcajes son conocidos por un experto en la técnica.

Los antígenos de acuerdo con la invención se pueden fusionar a otra proteína. El término "proteína de fusión", tal como se usa en la presente invención se refiere a una proteína que comprende al menos una parte de proteína

correspondiente a un antígeno TpN47 de acuerdo con la invención y al menos una parte de proteína derivada de otra proteína que sirve el papel de una pareja de fusión.

De acuerdo con otra realización de la presente invención los antígenos TpN47 pueden fusionarse con chaperonas. Las chaperonas, que son conocidas como ayudantes de plegado clásicos, son proteínas que ayudan al plegamiento y mantenimiento de la integridad estructural de otras proteínas. Los ejemplos de ayudantes de plegado se describen en detalle en el documento WO 03/000877. De acuerdo con las chaperonas invención de la clase peptidil prolil isomerasa tales como las chaperonas de la familia FKBP se pueden utilizar para la fusión al antígeno TpN47. Ejemplos de chaperonas FKBP adecuadas como parejas de fusión para los antígenos TpN47 son FkpA, SlyD y SlpA. Una chaperona más adecuada como pareja de fusión para TpN47 es Skp, una chaperona periplásmica trimérica de *E. coli*, no perteneciente a la familia FKBP. No siempre es necesario utilizar la secuencia completa de una chaperona. Se pueden utilizar también fragmentos funcionales de parejas (los llamados módulos competentes de unión) que aún poseen las aptitudes y funciones necesarias (véase el documento WO 98/13496).

De acuerdo con una realización adicional de la invención, al menos uno o al menos dos módulos de una chaperona FKBP, tales como por ejemplo, SlyD, FkpA o SlpA de *E. coli* se utilizan como porciones de fusión para la expresión de los antígenos TpN47. La chaperona Skp se puede utilizar también como una pareja de fusión. La fusión de dos dominios de chaperona FKBP resulta en la mejora de la solubilidad del polipéptido de fusión resultante. Las porciones de fusión pueden estar ubicadas en N-terminal o C-terminal o en ambos extremos (similar a sándwich) del antígeno TpN47.

Los antígenos TpN47 de acuerdo con la invención se pueden generar y prepararse por medio de técnicas de DNA recombinante. Otro aspecto de la invención por lo tanto es una molécula de DNA recombinante que codifica un antígeno TpN47 y variantes del mismo como se define anteriormente.

El término "molécula de DNA recombinante" se refiere a una molécula que está hecha por la combinación de dos segmentos de secuencia que están separados normalmente, realizada por la manipulación artificial de segmentos aislados de polinucleótidos mediante técnicas de ingeniería genética o por síntesis química. De este modo uno puede unir segmentos de polinucleótidos de funciones deseadas para generar una combinación deseada de funciones. Las técnicas de DNA recombinantes para la expresión de proteínas en células huésped eucariotas o procariotas inferiores o superiores son bien conocidas en la técnica. Se han descrito, por ejemplo, por Sambrook et al, (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual).

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a una molécula de DNA recombinante, que codifica un antígeno 47 de *Treponema pallidum* (TpN47), que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un antígeno TpN47 que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con los residuos de aminoácidos 63 a 174 (dominio B) del Id. de Sec. N° 1 con la condición de que dicha molécula de DNA recombinante carece de la región de codificación para los residuos de aminoácidos 224 a 351 (dominio C) de Id. de Sec. N° 1.

En otra realización de la invención, una molécula de DNA recombinante codifica un antígeno TpN47 que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con los residuos de aminoácido 26 a 223 (dominio A+B) del Id. de Sec. N° 1 con la condición de que dicha molécula de DNA recombinante carece de la región de codificación para los residuos de aminoácidos 224 a 351 (dominio C) de Id. de Sec. N° 1.

En una realización adicional de la invención una molécula de DNA recombinante codifica un antígeno TpN47 que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con los residuos de aminoácidos 63 a 174 (dominio B) o los residuos de aminoácidos 26 a 223 (dominio A+B) del Id. de Sec. N° 1. Además, la molécula de DNA recombinante codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el dominio D, es decir, los residuos de aminoácidos 352 a 434 del Id. de Sec. N° 1. Como se ha descrito antes, también en estas formas de realización se aplica la condición de que dichas moléculas de DNA recombinante carecen de la región de codificación para los residuos de aminoácidos 224 a 351 (dominio C) de Id. de Sec. N° 1.

Las moléculas de DNA recombinantes de acuerdo con la invención también pueden contener secuencias que codifican péptidos enlazantes de 10 a 100 residuos de aminoácidos entre el antígeno TpN47 y las porciones de fusión y también entre varias porciones de fusión. Tal secuencia enlazante puede, por ejemplo, albergar un sitio de escisión proteolítica.

Un aspecto adicional de la invención es un vector de expresión que comprende una molécula de DNA recombinante operativamente unida de acuerdo con la presente invención, es decir, una molécula de DNA recombinante que codifica un antígeno TpN47 o una molécula de DNA recombinante que codifica una proteína de fusión que comprende un antígeno TpN47 y una chaperona peptidil prolil isomerasa, tal como una chaperona FKBP, en el que la chaperona FKBP se selecciona de entre FkpA, SlyD y SlpA. En una realización alternativa la molécula de DNA recombinante codifica una proteína de fusión que comprende un antígeno TpN47 y Skp. El vector de expresión que comprende un DNA recombinante de acuerdo con la presente invención puede usarse para expresar el antígeno TpN47 en un sistema de traducción libre de células o puede utilizarse para transformar una célula huésped para la expresión del antígeno TpN47 de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Otro aspecto de la invención

por lo tanto se refiere a una célula huésped transformada con un vector de expresión de acuerdo con la presente invención. En una realización de la invención actual los antígenos recombinantes TpN47 se producen en células de *E. coli*.

5 También se contempla un método para producir un antígeno TpN47 soluble, estable e inmunorreactivo, que también puede producirse como una proteína de fusión que contiene el antígeno TpN47 y una chaperona tales como Skp o una chaperona de clase peptidil prolil isomerasa tal como una chaperona FKBP. En una realización adicional de la invención dicha chaperona FKBP se selecciona del grupo que consiste de SlyD, FkpA y SlpA.

10 Este método comprende los pasos de

- a) cultivar células huésped transformadas con el vector de expresión anteriormente descrito que contiene un gen que codifica un antígeno TpN47
- b) la expresión del gen que codifica dicho antígeno TpN47
- 15 c) la purificación de dicho antígeno TpN47.

Opcionalmente, como un paso adicional d), la solubilización funcional necesita llevarse a cabo de manera que el antígeno TpN47 se pone en una conformación soluble e inmunorreactiva por medio de técnicas de replegamiento conocidas en la técnica.

20 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para la detección de anticuerpos anti-Treponema en una muestra humana aislada en la que un antígeno TpN47 de acuerdo con la invención se usa como una pareja de unión para los anticuerpos. Así, la invención abarca un método para la detección de anticuerpos específicos para Treponema en una muestra aislada, comprendiendo dicho método

- 25 a) formar una mezcla de inmunorreacción mezclando una muestra de fluido corporal con un antígeno TpN47 de acuerdo con la invención
- b) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un período de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos contra dicho antígeno TpN47 presente en la muestra de fluido corporal inmunorreacte con dicho antígeno TpN47 para formar un producto de inmunorreacción; y
- 30 c) detectar la presencia y / o la concentración de cualquiera de dichos productos de inmunorreacción.

En un aspecto adicional, dicho método es adecuado para la detección de anticuerpos de Treponema de la subclase IgG y la IgM.

35 Los inmunoensayos para la detección de anticuerpos son bien conocidos en la técnica, y también lo son los métodos para llevar a cabo tales ensayos y las aplicaciones prácticas y procedimientos. Los antígenos TpN47 de acuerdo con la invención se pueden usar para mejorar los ensayos para la detección de anticuerpos anti-Treponema independientemente de los marcajes utilizados e independientemente del modo de detección (por ejemplo, ensayo de radioisótopo, inmunoensayo enzimático, ensayo de electroquimioluminiscencia, etc.) o el principio del ensayo (por ejemplo, ensayo de tira reactiva, ensayo sándwich, concepto de prueba indirecta o ensayo homogéneo, etc.). Todos los líquidos biológicos conocidos por el experto se pueden utilizar como muestras para la detección de anticuerpos anti-Treponema. Las muestras utilizadas generalmente son líquidos corporales como sangre entera, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina o saliva.

45 Una realización adicional de la invención es un inmunoensayo para detectar anticuerpos anti-Treponema en una muestra aislada realizado de acuerdo con el llamado concepto sándwich de doble antígeno (DAGS). A veces, este concepto de ensayo también se denomina concepto de puente de doble antígeno, debido a que los dos antígenos están puenteados por un analito de anticuerpo. En un ensayo de este tipo se requiere y se utiliza la capacidad de un anticuerpo para unirse al menos a dos moléculas diferentes de un antígeno determinado, con sus dos (IgG, IgA, IgE) o diez paratopos (IgM).

50 En más detalle, un inmunoensayo para la determinación de anticuerpos anti-Treponema de acuerdo con el formato puente de doble antígeno se lleva a cabo mediante la incubación de una muestra que contiene los anticuerpos anti-Treponema con dos antígenos TpN47 diferentes, es decir, un primer antígeno TpN47 ("fase sólida") y un segundo antígeno TpN47 ("detección"), en el que cada uno de dichos antígenos se une específicamente a dichos anticuerpos anti-Treponema. El primer antígeno puede estar unido directa o indirectamente a una fase sólida y por lo general lleva un grupo efector que es parte de un par de unión similar a bioafin, por ejemplo, biotina y avidina. Por ejemplo, si el primer antígeno está conjugado a biotina la fase sólida se recubre con cualquiera de avidina o estreptavidina. El segundo antígeno lleva un marcaje. Por lo tanto se forma una mezcla de inmunorreacción que comprende el primer antígeno, el anticuerpo muestra y el segundo antígeno. Se añade una fase sólida a la que el primer antígeno se puede unir ya sea antes de la adición de la muestra a dichos antígenos o después de que se forme la mezcla de inmunorreacción. Esta mezcla de inmunorreacción se mantiene durante un período de tiempo suficiente para permitir que anticuerpos anti-Treponema contra dichos antígenos TpN47 en la muestra de fluido corporal inmunorreacten con dichos antígenos TpN47 para formar un producto de inmunorreacción. El siguiente paso es un paso de

separación en el que la fase líquida se separa de la fase sólida. Finalmente, se detecta la presencia de cualquiera de dichos productos de inmunoreacción en la fase sólida o líquida o ambas.

En dicho inmunoensayo DAGS las estructuras básicas del "antígeno en fase sólida" y el "antígeno de detección" son esencialmente los mismos. También es posible utilizar, en un ensayo de puente de doble antígeno, antígenos TpN47 similares pero diferentes, que son inmunológicamente de reacción cruzada. El requisito esencial para la realización de tales ensayos es que el epítipo correspondiente o los epítopos relevantes estén presentes en ambos antígenos. De acuerdo con la invención, es posible usar porciones de fusión diferentes para cada antígeno TpN47 (por ejemplo, SlyD fusionado a TpN47 en el lado de la fase sólida y FkpA fusionado a TpN47 en el lado de detección) ya que tales variaciones alivian significativamente el problema de la unión no específica y por lo tanto mitigan el riesgo de falsos resultados positivos.

Por lo tanto, una realización adicional de la presente invención es un inmunoensayo de acuerdo con el concepto de puente de doble antígeno, en la que se utilizan un primer antígeno o proteína de fusión de TpN47 de acuerdo con la presente invención, y un segundo antígeno o proteína de fusión de TpN47 de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere además al uso de al menos un antígeno de TpN47 en una prueba de diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-Treponema.

Un objeto adicional de la invención es un equipo de reactivos para la detección de anticuerpos contra Treponema, que contiene, además de los aditivos de ensayo habituales para ensayos inmunológicos, al menos un antígeno de los antígenos adecuados de TpN47 para unirse específicamente a anticuerpos de Treponema para determinarse y posiblemente llevar un marcaje, así como otros aditivos habituales si es necesario. En particular, el equipo de reactivos contiene un antígeno TpN47 que comprende los residuos de aminoácidos 63 a 174 (dominio B) del Id. de Sec. N° 1 o un antígeno TpN47 que comprende los residuos de aminoácidos 26 a 223 (dominio A + B) del Id. de Sec. N° 1, con la condición de que cada uno de dichos antígenos carece de secuencias que corresponden a los residuos de aminoácidos 224 a 351 (dominio C) de Id. de Sec. N° 1. Los antígenos que forman parte de dicho equipo de reactivos se fusionan a una chaperona.

En una realización adicional, dicho equipo reactivo comprende un antígeno TpN47 que comprende los dominios B o A+B como se ha definido antes y, además, comprende el dominio D, es decir, los residuos de aminoácidos 352-434 del Id. de Sec. N° 1. También en esta realización el antígeno TpN47 carece de dominio C, es decir, los residuos de aminoácidos 224 a 351 no están presentes en este antígeno de TpN47.

Además, los equipos de reactivos definidos anteriormente contienen controles y soluciones estándar, así como reactivos en una o más soluciones con los aditivos, tampones, sales, detergentes habituales, etc. utilizados por el experto medio en la técnica.

Otro aspecto es el uso de los antígenos de TpN47 de acuerdo con la invención como vacunas. La preparación de vacunas que contienen un polipéptido inmunogénico como ingrediente activo es conocido en la técnica. Tales vacunas se preparan comúnmente como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas. El ingrediente activo, es decir, el antígeno TpN47 o su proteína de fusión se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo como por ejemplo agua, tampones fisiológicos acuosos, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol. Las vacunas se administran convencionalmente por vía parenteral, mediante inyección.

Otra realización es una composición de al menos dos antígenos de Treponema pallidum que comprenden un antígeno TpN47 de acuerdo con la presente invención y al menos un antígeno adicional de Treponema pallidum seleccionado del grupo que consiste de un antígeno de TpN17 y un antígeno TpN15 de modo que dicha composición comprende un antígeno TpN47, un antígeno TpN17 o un antígeno TpN15 o ambos antígenos TpN15 y TpN17. Sin embargo, una realización adicional es una composición de al menos tres antígenos de Treponema pallidum que comprenden un antígeno TpN47 de acuerdo con la presente invención y ambos un antígeno TpN17 y un antígeno TpN15.

La invención también se refiere al uso de un antígeno TpN47 de acuerdo con la invención en una prueba de diagnóstico in vitro para la detección de anticuerpos anti-Treponema pallidum.

La sección de ejemplos ilustra adicionalmente la invención. En particular, los ejemplos ilustran que hemos desarrollado y generado variantes de TpN47 que son más solubles y significativamente menos termolábiles que la molécula de proteína TpN47 de longitud completa. Tanto la solubilidad y la estabilidad se mejoran. Nuestras variantes de TpN47 pueden sobreexpresarse abundantemente por ejemplo en E. coli, son fácilmente purificadas y replegadas a través de cromatografía de quelatos metálicos inmovilizados (IMAC), presentan propiedades de estabilidad satisfactorias y pueden utilizarse para detectar de forma fiable anticuerpos anti-Treponema en suero humano (en una forma de realización adicional en combinación con TpN17 y/o TpN15, otras dos proteínas de membrana de Treponema pallidum inmunodominantes). Es de destacar que las proteínas de fusión FkpA-TpN47/AB y Skp-TpN47/AB forman oligómeros naturales con densidades de epítopos que son suficientes para detectar incluso

moléculas de IgM. Dado que nuestro objetivo es el desarrollo de un inmunoensayo para la detección de la inmunoglobulina total (es decir la detección de IgG e IgM), las especies oligoméricas FkpA-TpN47/AB y Skp-TpN47/AB se pueden utilizar ventajosamente como especificadores en ambos lados de un formato DAGS (por ejemplo, FkpA-TpN47/AB-biotina y Skp-TpN47/AB-rutenio, o viceversa).

Ejemplo 1

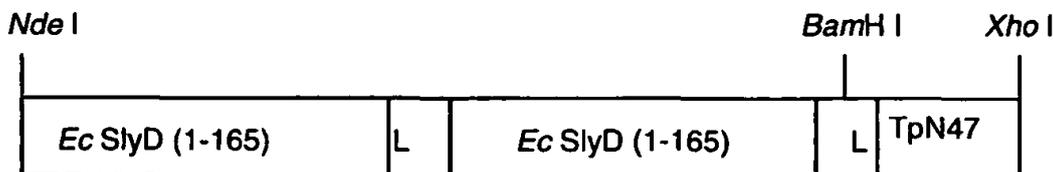
Clonación y purificación de polipéptidos de fusión TpN47 y TpN47 con chaperona

Clonación de casetes de expresión

Sobre la base del plásmido de expresión pET24a de Novagen (Madison, WI, EE.UU.) se obtuvieron casetes de expresión que codifican las proteínas de fusión EcSlyD-EcSlyD-TpN47 esencialmente como se describe en (Scholz, C. et al., J. Mol. Biol. (2005) 345, 1229-1241). La secuencia del antígeno TpN47 fue recuperado de la base de datos SwissProt (SwissProt ID P29723). Un gen sintético que codifica TpN47 madura aa 21-434 (el péptido señal que abarca los residuos de aminoácidos 1-20 se omitió) con una región enlazante rica en glicina fusionado en marco al extremo N-terminal se adquirió de Medigenomix (Martinsried, Alemania). El único residuo de cisteína de TpN47 en la posición 315 se cambió a alanina con el fin de prevenir efectos secundarios no deseados, tales como la oxidación o puentes disulfuro intermoleculares. Los sitios de restricción BamHI y XhoI se encontraban en los extremos 5' y 3' de la región de codificación de TpN47, respectivamente. Un gen sintético adicional que codifica dos unidades de EcSlyD (residuos 1-165 de acuerdo con Id. de Sec. N° 1, n° de acceso SwissProt P0A9K9) conectado a través de una región de enlace rica en glicina y que abarca parte de una región de enlace adicional en el C-terminal se compró igualmente de Medigenomix. Los sitios de restricción NdeI y BamHI estaban en el 5' y 3' de este casete, respectivamente. Los genes y los sitios de restricción fueron diseñados para permitir la fusión en marco de la parte de chaperona de EcSlyD-EcSlyD y la parte de antígeno TpN47 mediante una ligación simple. A fin de evitar procesos de recombinación inadvertidos y para aumentar la estabilidad genética del casete de expresión en el huésped E. coli, las secuencias de nucleótidos que codifican las unidades EcSlyD estaban degeneradas igual que las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones enlazantes extendidas, es decir, se utilizaron diferentes combinaciones de codones para codificar secuencias de aminoácidos idénticas.

El vector pET24a se digirió con NdeI y XhoI y se insertó el casete que comprende el tándem-SlyD fusionado en el marco con el fragmento 21 a 434 de Treponema TpN47 (Cys 315 Ala). Los casetes de expresión que comprenden SlyD o Skp o FkpA se construyeron de acuerdo con esto, así como los casetes de expresión que comprenden polipéptidos diana diferentes de TpN47 de longitud completa, en particular los dominios y combinaciones de dominio B (TpN47 63-174), AB (TpN47 26-223), C (TpN47 224-351), CD (TpN47 224-434) y D (TpN47 352-434). Todas las variantes de polipéptidos de fusión recombinante contenían un marcaje de hexahistidina C-terminal para facilitar la purificación asistida-Ni-NTA y el replegamiento. Se utilizaron las técnicas QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) y técnicas estándar de PCR para generar mutaciones puntuales, deleciones, variantes de inserción y de extensión o sitios de restricción en los respectivos casetes de expresión.

El dibujo de abajo muestra un esquema del antígeno 21-434 de TpN47 de longitud completa de Treponema portando dos unidades de chaperonas SlyD fusionadas en marco a su extremo N-terminal. Para indicar el origen de E. coli de la pareja de fusión SlyD, el polipéptido de fusión representado ha sido nombrado EcSlyD-EcSlyD-TpN47 (21-434).



L = (GGGS)<sub>5</sub>GGG-Enlazante

El inserto del plásmido resultante se secuenció y se encontró que codificaba la proteína de fusión deseada. La secuencia de aminoácidos completa de cada antígeno TpN47 individual se muestra en los Id. de Sec. N° 1 a 6. La secuencia de aminoácidos del enlazante L se muestra en Id. de Sec. N° 7.

Purification de proteínas de fusión que comprenden TpN47

Todas las variantes de proteínas de fusión TpN47 se purificaron mediante el uso de protocolos prácticamente idénticos. Células de E. coli BL21 (DE3) que albergan el plásmido de expresión pET24a particular, se cultivaron a 37 °C en medio LB más kanamicina (30 µg/ml) hasta una DO<sub>600</sub> de 1,5, y la sobreexpresión citosólica se indujo mediante la adición de isopropil β-D-tiogalactósido 1 mM. Tres horas después de la inducción, las células se

recogieron por centrifugación (20 min a 5000 g), se congelaron y almacenaron a -20 °C. Para la lisis celular, el sedimento congelado se resuspendió en fosfato de sodio refrigerado 50 mM pH 8,0, GdmCl 7,0 M, imidazol 5 mM y la suspensión se agitó durante 2 h en hielo para completar la lisis celular. Después de la centrifugación y filtración (0,45 µm/0,2 µm), el lisado crudo se aplicó sobre una columna Ni-NTA equilibrada con el tampón de lisis incluyendo TCEP 5,0 mM. El paso de lavado posterior se adaptó para la correspondiente proteína diana y varió entre 5 a 15 volúmenes del tampón de lavado. Entonces, la solución GdmCl fue sustituido por fosfato de potasio 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, imidazol 10 mM, TCEP 5,0 mM para inducir el replegamiento conformacional de la proteína unida a la matriz. Con el fin de evitar la reactivación de proteasas copurificadas, un cóctel inhibidor de proteasa (Complete® libre de EDTA, Roche) se incluyó en el tampón de replegamiento. Un total de 15-20 volúmenes de tampón de replegamiento se aplicaron a la columna en una reacción durante la noche. Entonces, tanto TCEP y el cóctel inhibidor de Complete® libre de EDTA se eliminaron por lavado con 3-5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, imidazol 10 mM. Posteriormente, la concentración de imidazol - todavía en 50 mM de fosfato de potasio pH 8,0, KCl 100 mM - se elevó a 25 mM con el fin de eliminar los contaminantes de proteínas unidas de forma inespecífica. A continuación, la proteína nativa se eluyó mediante imidazol 500 mM en el mismo tampón. Se analizaron las fracciones que contienen proteínas por su pureza mediante Tricina-SDS-PAGE y se agruparon. Finalmente, las proteínas se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex HiLoad, Amersham Pharmacia) y las fracciones que contienen proteínas se agruparon y se concentraron hasta 10-20 mg / ml en una celda Amicon (YM10).

Después de la purificación acoplada y el protocolo de replegamiento, se pueden obtener rendimientos de proteína de aproximadamente 5-20 mg a partir de 1 g de células de E. coli húmedas, dependiendo de la correspondiente proteína diana.

## Ejemplo 2

### Mediciones espectroscópicas

Las mediciones de concentración de proteínas se realizaron con un espectrofotómetro de doble haz Uvikon XL. Los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon_{M280}$ ) se determinaron usando el procedimiento descrito por Pace (1995), Protein Sci. 4, 2411-2423. Los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon_{M280}$ ) utilizados para los distintos polipéptidos de fusión TpN47 se especifican en la tabla 1.

Tabla 1: Parámetros de proteínas de las variantes de fusión de TpN47 utilizadas en esta estudio

proteína de fusión	fragmento de TpN47 (residuos de aa)	peso molecular (Da)	pI	$\epsilon_{M280} M^{-1} cm^{-1}$	Abs <sub>0,19%</sub> (= 1 mg/ml)
Variantes de dominio TpN47					
EcSlyD-EcSlyD-TpN47	21-434	85.390	4,9	63.720	0,746
EcSlyD-EcSlyD-TpN47/AB	26-223	61.641	4,8	33.350	0,541
EcSlyD-EcSlyD-TpN47/B	63-174	52.267	4,8	21.890	0,419
EcSlyD-EcSlyD-TpN47/D	352-434	48.561	4,7	14.900	0,307
EcSlyD-EcSlyD-TpN47/C	224-351	52.249	4,9	39.310	0,725
EcSlyD-EcSlyD-TpN47/CD	224-434	62.976	4,8	42.290	0,672
Variantes de péptido TpN47					
EcSlyD-TpN47/p02-1	30-66	24.382	4,7	15.930	0,653
EcSlyD-TpN47/p03-1	106-132	23.667	5,1	12.950	0,547
EcSlyD-TpN47/p04-1	137-170	24.211	4,8	7.450	0,308
EcSlyD-TpN47/p05-1	197-219	23.052	4,8	5.960	0,259
EcSlyD-TpN47/p06-1	225-250	23.284	4,8	7.450	0,320
EcSlyD-TpN47/p07-1	273-296	23.307	4,8	13.410	0,575
EcSlyD-TpN47/p08-1	321-362	25.274	5,0	11.920	0,472
EcSlyD-TpN47/p09-1	368-388	22.545	4,7	5.960	0,264
EcSlyD-TpN47/P10-1	391-434	25.279	5,0	7.450	0,295

Las secuencias de aminoácidos de las variantes de dominio de TpN47 se muestran en el Id. de Sec. N° 1 a 6. Las secuencias específicas de TpN47 derivadas de Swiss Prot P29723 de las variantes de péptido TpN47 p02-1 a p10-1 se resumen en la Id. de Sec. N° 8 a 16.

## Ejemplo 3

Acoplamiento de grupos de biotina y de rutenio a las proteínas de fusión

Los grupos lisina  $\epsilon$ -amino de los polipéptidos de fusión se modificaron a concentraciones de proteína de 10 a 30 mg / ml con biotina activada con N-hidroxi-succinimida y moléculas de marcaje de rutenio, respectivamente. La relación de marcaje / proteína varió de 2:1 a 5:1 (mol:mol), dependiendo de la proteína de fusión correspondiente. El tampón de reacción fue fosfato de potasio 150 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 min y se detuvo mediante la adición de L-lisina tamponada a una concentración final de 10 mM. Para evitar la inactivación hidrolítica del marcaje, las correspondientes soluciones madre se prepararon en DMSO seco (SeccoSolv quality, Merck, Alemania). Las concentraciones de DMSO de hasta 20% en el tampón de reacción fueron bien tolerados por todas las proteínas de fusión estudiadas. Después de la reacción de acoplamiento, los marcajes libres no reaccionados se eliminaron haciendo pasar el conjugado de proteína bruta sobre una columna de filtración en gel (Superdex 200 HiLoad).

#### Ejemplo 4

##### Reactividad inmunológica de los polipéptidos de proteínas de fusión

La reactividad inmunológica (es decir, la antigenicidad) de las diferentes proteínas de fusión se evaluó en un analizador automatizado Elecsys® 2010 (Roche Diagnostics GmbH). Elecsys® es una marca registrada del grupo Roche. Las mediciones se llevaron a cabo en el formato sándwich de doble antígeno.

La detección de señales en Elecsys® 2010 se basa en electroquimioluminiscencia. El conjugado de biotina (es decir, el antígeno de captura) se inmoviliza sobre la superficie de una perla magnética recubierta con estreptavidina mientras que el antígeno de detección lleva un catión rutenio acoplado (conmutación entre los estados redox 2+ 3+) como porción de señalización. En presencia de un analito de inmunoglobulina específico, el complejo de rutenio cromogénico se puentea a la fase sólida y emite luz a 620 nm después de la excitación en un electrodo de platino. La salida de señal es en unidades de luz arbitrarias.

Las variantes recombinantes de TpN47 de *Treponema* fueron se analizaron por pares en un formato de inmunoensayo en sándwich de doble antígeno (DAGS). Por ejemplo, un conjugado EcSlyD-EcSlyD-TpN47/AB (26-223)-biotina se analizó junto con un conjugado de complejo EcSlyD-EcSlyD-TpN47/AB (26-223)-rutenio a una concentración de 70 ng/ml cada uno. Además, un conjugado EcSlyD-EcSlyD-TpN47/B (63-174)-biotina se aplica junto con un conjugado de complejo EcSlyD-EcSlyD-TpN47/B (63-174)-rutenio a una concentración de 70 ng/ml cada uno.

Los conjugados de biotina y de rutenio de las variantes de polipéptido de fusión de TpN47 se aplicaron a concentraciones de 70 ng/ml cada uno. En todas las mediciones, se aplicó EcSlyD-EcSlyD químicamente polimerizado y no marcado en un gran exceso ( $\sim 10 \mu\text{g/ml}$ ) en el tampón de reacción como una sustancia anti-interferencia para evitar reacciones cruzadas inmunológicas a través de la unidad de fusión de chaperona. Se utilizaron como controles suero humano negativo anti-*Treponema*.

En la Tabla 2 (Fig. 8a-c), se muestra la actividad inmunológica de las variantes de fusión de péptido TpN47 (que figuran en la tabla 1). Es evidente a primera vista que la antigenicidad de los fragmentos cortos de TpN47 es muy pobre en comparación con la molécula de longitud completa de TpN47. Sólo EcSlyD-TpN47/p02-1 (TpN47 30-66) presenta una antigenicidad significativa, aunque en un grado muy bajo. A partir de nuestros resultados concluimos que algunos epítomos lineales débiles pueden residir en la parte N-terminal de TpN47, mientras que el resto de la molécula de TpN47 no alberga ningún epítomo lineal detectable en nuestra configuración DAGS. Este hallazgo es sorprendente en desacuerdo con la presentación de datos en la literatura sobre epítomos inmunodominantes cortos dentro del antígeno TpN47 de *Treponema* (Baughn et al., *Journal of Immunology* (1996) 15 de julio; 157 (2): 720-31). En contraste con estos datos de la literatura, nuestros resultados experimentales con fragmentos cortos de TpN47 sugiere que los epítomos lineales juegan un papel más bien subordinado en la respuesta inmune humoral después de la infección con *Treponema*.

Como consecuencia directa, abandonamos los intentos para identificar epítomos lineales y en su lugar nos centramos en la identificación de los epítomos conformacionales. Para alcanzar este objetivo, nos centramos en los dominios TpN47 descritos en Ranjit et al., *J. Biol. Chem.* (2002) 277 (44), pp 41857-41864). A diferencia de los péptidos cortos no estructurados, los dominios aislados (es decir, unidades de plegamiento autónomas) de una proteína se supone que adoptan una conformación definida y por lo tanto se espera que presenten epítomos conformacionales. Sin embargo, no quedaba nada claro si los dominios aislados de TpN47 serían capaces de adoptar una conformación similar a la nativa cuando se escindieran del contexto estructural de la proteína de longitud completa. De hecho, resultó que los dominios de TpN47 aislados presentan una actividad inmunológica tremendamente alta en comparación con los pequeños fragmentos de TpN47 no estructurados (véase la tabla 3 para los resultados, figura 9). A partir de estos datos, se deduce que los dominios aislados son realmente capaces de adoptar una conformación bien ordenada, similar a la nativa. A juzgar por nuestras evaluaciones inmunológicas, la antigenicidad de los fragmentos de dominio aumenta en el orden C <D <CD <B <AB <ABCD; en particular, la combinación del dominio AB de TpN47 produce aproximadamente el 50% del nivel de señal de la proteína de longitud completa con sueros humanos positivos anti-*Treponema*.

## Ejemplo 5

Termoestabilidad de las fusiones de dominio de TpN47 tal como se analizó mediante análisis de FPLC

5 Después de haber reunido pruebas convincentes de que los dominios de TpN47 (es decir, las unidades plegables autónomas bien ordenadas con conformación definida) presentan antigenicidad significativa, nos preguntamos si los dominios distintos poseerían diferente estabilidad cuando se exponen al estrés térmico. Para abordar esta cuestión, se incubaron todas nuestras proteínas de fusión de dominio de TpN47 en idénticas condiciones y se sometieron a temperaturas elevadas (la incubación durante la noche en fosfato de potasio 150 mM, pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM a 30 °C, 35 °C y 40 °C, a una concentración de proteína de 1,3 mg/ml cada uno). A continuación, se analizaron todas las muestras mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica (Superdex 200) y se verificaron tanto la recuperación de la señal (área de pico bajo la curva de absorción) como la tendencia a agregarse (es decir, la elución de las partículas grandes en el volumen vacío de la columna de filtración en gel) para cada proteína de fusión de TpN47. Los resultados se muestran en las figuras 1-6. Resultó que la tendencia a formar agregados inducidos por la temperatura disminuye significativamente en el orden TpN47 de longitud completa > CD > C > D, B, AB. En resumen, los dominios D, B y AB de TpN47 son mucho menos propensas a la agregación que TpN47 de longitud completa. Tras el estrés térmico, muestran invariablemente una recuperación de la señal excelente en sus perfiles de elución y presentan sólo una tendencia insignificante para formar asociados o agregados. Por el contrario, todas las variantes de TpN47 que comprenden el dominio C (es decir, TpN47 de longitud completa, C, CD) presentan una fuerte tendencia a agregarse incluso a una temperatura moderadamente elevada tal como 35 °C.

## Ejemplo 6

25 Termoestabilidad de fusiones de dominio de TpN47 en inmunoensayo según se analizó mediante mediciones por Elecsys®.

30 Para determinar la termotolerancia de las diferentes proteínas de fusión de TpN47 mediante las mediciones Elecsys®, las variantes EcSlyD-EcSlyD-TpN47 se sometieron a condiciones de temperatura elevada de la siguiente manera: EcSlyD-EcSlyD-TpN47 biotina y conjugados de rutenio se incubaron, por separado, a 42 °C durante tres días. La concentración de los conjugados en este ensayo de estrés fue de 70 ng/ml cada uno (~ 1 nM), el tampón de ensayo fue de 100 mM de MES pH 6,5, NaCl 300 mM, EDTA 2 mM. Posteriormente, se analizaron las muestras térmicamente estresadas por su reactividad inmunológica residual (es decir, su antigenicidad residual) en un analizador automático Elecsys® 2010 bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente. Las muestras no expuestas (almacenadas a 2-8 °C) de EcSlyD-EcSlyD-TpN47 se utilizaron como referencia.

Los resultados de los experimentos se muestran en las tablas 4-6 (figuras 10-12).

40 La Tabla 4 (figura 10) representa la reactividad inmunológica de EcSlyD-EcSlyD-TpN47/AB (26-223) y EcSlyD-EcSlyD-TpN47/B (63-174) con sueros humanos anti-Treponema positivos y anti-Treponema negativos en un analizador automático Elecsys® como se ha descrito. Se muestra el rendimiento de las dos variantes de antígeno antes y después de tres días de incubación a 42 °C. La Tabla 5 (figura 11) muestra la antigenicidad de EcSlyD-EcSlyD-TpN47 C (224-351) y EcSlyD-EcSlyD-TpN47 D (352-434), y la tabla 6 (figura 12) muestra la antigenicidad de EcSlyD-EcSlyD-TpN47 CD (224-434) y TpN47 de longitud completa (21-434).

45 Los resultados de los experimentos demuestran claramente la superioridad de los dominios de TpN47 estresados por calor sobre la proteína TpN47 de longitud completa en términos de recuperación de la señal.

50 Tras la estimulación térmica, la recuperación de la señal de TpN47 de longitud completa (21-434) se reduce a aproximadamente el 50% de los valores iniciales, mientras que la recuperación de la señal de TpN47/B, TpN47/AB y TpN47/D asciende a -93%, -88% y 100% de los valores iniciales, respectivamente. Por lo tanto, la recuperación de la señal mejora notablemente cuando se utilizan los dominios de TpN47 en lugar de la molécula de longitud completa.

55 Se debe destacar que el dominio C de TpN47 (224-351) no presenta ninguna actividad inmunológica (para los resultados véase el cuadro 5, figura 11). Este hallazgo contrasta claramente con la antigenicidad encontrada para los demás dominios de TpN47 y las combinaciones de dominio B, AB, CD y D. Al parecer, el dominio C contribuye poco o nada - por lo menos en aislamiento - a la asombrosa antigenicidad de la molécula de proteína TpN47.

60 La variante de la fusión CD de TpN47 (224-434) es notable en que su recuperación de la señal después del estrés térmico asciende a aproximadamente el 70% y es claramente inferior a los otros dominios de TpN47 y combinaciones de dominio (véase los resultados en la tabla 6, figura 12). La recuperación de la señal del dominio D por sí sola es muy alta y casi sin cambios después del estrés térmico (véase el cuadro 5, figura 11).

65 En resumen, la TpN47 dominios B, AB y D muestran una recuperación de la señal claramente mejorado tras la exposición térmica en comparación con los de larga duración TpN47.

De acuerdo con nuestra invención, el dominio C (224-351) es prescindible para fines de inmunodiagnóstico ya que no contribuye notablemente a la antigenicidad de TpN47. Además, el dominio C, cuando se fusiona al dominio D, debilita la estabilidad del constructo CD (224 a 434), que presenta – excepto TpN47 de longitud completa - la recuperación de señal más baja de todos los dominios y combinaciones de dominio analizadas (~ 70%, véase los resultados en la tabla 6, figura 12).

El rendimiento de señal relativa (tras el estrés térmico) de los diferentes dominios de TpN47 según el análisis de un inmunoensayo automatizado como Elecsys® se correlaciona muy bien con nuestros resultados en el análisis de FPLC. Esto es notable tanto más cuanto que ambos experimentos se han llevado a cabo a concentraciones muy diferentes: Las concentraciones de proteína en los análisis FPLC estaban en el rango micromolar medio (15,2  $\mu\text{M}$  - 26,7  $\mu\text{M}$ ), mientras que las concentraciones de proteínas en los análisis inmunológicos estaban en un rango nanomolar muy bajo (0,82 nM - 1,44 nM). Se espera que la eliminación de un dominio que induce a la agregación tal como el dominio C de TpN47 debe producir mejores resultados (es decir, aliviar los efectos de agregación) bajo condiciones de alta concentración de proteínas.

Nuestros datos inmunológicos muestran inequívocamente que la eliminación del dominio C mejora claramente tanto la estabilidad y la solubilidad del resto de la molécula de TpN47, incluso en condiciones de muy baja concentración de proteínas. Este hallazgo permite el desarrollo de equipos de inmunoensayo más robustos y constituye un logro importante en la detección serológica basada en TpN47 de anticuerpos anti-Treponema.

Nuestros experimentos proporcionan evidencias convincentes de que TpN47 de longitud completa es muy propensa a la agregación cuando se expone a temperaturas moderadamente elevadas superiores a 35 °C. A partir de estas observaciones, inferimos que el uso de TpN47 de longitud completa recombinante es crítico para la especificidad y la sensibilidad de cualquier inmunoensayo de Treponema, a menos que se tomen precauciones para evitar la pérdida inducida térmicamente de esta molécula propensa a la agregación de la mezcla de ensayo. Una forma sencilla y cómoda de eludir (o al menos mitigar) la agregación inducida térmicamente de TpN47 se describe en esta solicitud de patente: consiste en simplemente omitir el dominio C de TpN47, que al parecer no contribuye directamente a la antigenicidad y que, por encima de esto, parece constituir un factor desestabilizador general dentro de la molécula TpN47. Tan pronto como el dominio C TpN47 se deja fuera (como en AB, B y D), la termolabilidad de la molécula de proteína TpN47 se mitiga significativamente.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un antígeno 47 soluble de *Treponema pallidum* (antígeno TpN47) que comprende los residuos de aminoácidos 63 a 174 (dominio B) de Swiss Prot P29723 con la condición de que dicho antígeno carece de los residuos de aminoácidos 224 a 351 (dominio C) de Swiss Prot P29723, en donde el antígeno TpN47 se fusiona con una chaperona.
- 10 2. Un antígeno 47 soluble de *Treponema pallidum* (antígeno TpN47) que comprende los residuos de aminoácidos 26 a 223 (dominio A+B) de Swiss Prot P29723 con la condición de que dicho antígeno carece de los residuos de aminoácidos 224 a 351 (dominio C) de Swiss Prot P29723, en donde el antígeno TpN47 se fusiona con una chaperona.
- 15 3. Un antígeno 47 soluble de *Treponema pallidum* (antígeno TpN47) soluble de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 (dominio B o A+B) que comprende adicionalmente los residuos de aminoácidos 352-434 de Swiss Prot P29723 (dominio D).
- 20 4. Un antígeno 47 soluble de *Treponema pallidum* (antígeno TpN47) que comprende los residuos de aminoácidos 63 a 174 (dominio B) de Swiss Prot P29723 con la condición de que dicho antígeno carece de los residuos de aminoácidos 224 a 351 (dominio C) de Swiss Prot P29723, adicionalmente que comprende los residuos de aminoácidos 352 a 434 de Swiss Prot P29723 (dominio D).
- 25 5. Un antígeno 47 soluble de *Treponema pallidum* (antígeno TpN47) que comprende los residuos de aminoácidos 26 a 223 (dominio A+B) de Swiss Prot P29723 con la condición de que dicho antígeno carece de los residuos de aminoácidos 224 a 351 (dominio C) de Swiss Prot P29723, que comprende adicionalmente los residuos de aminoácidos 352 a 434 de Swiss Prot P29723 (dominio D).
- 30 6. Una molécula de DNA recombinante que codifica un antígeno 47 de *Treponema pallidum* (antígeno TpN47) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 7. Un vector de expresión que comprende una molécula de DNA recombinante unida operativamente de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Una célula huésped transformada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7.
- 40 9. Un método de producir un antígeno 47 soluble e inmunorreactivo de *Treponema pallidum* (antígeno TpN47), comprendiendo dicho método los pasos de
  - cultivar células huésped de acuerdo con la reivindicación 8
  - expresión de dicho antígeno TpN47 y
  - la purificación de dicho antígeno TpN47.
- 45 10. Una composición de al menos dos antígenos de *Treponema pallidum* que comprenden un antígeno TpN47 de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 y al menos un antígeno adicional de *Treponema pallidum* seleccionado del grupo que consiste en un antígeno TpN17 y un antígeno TpN15.
- 50 11. Un método para detectar anticuerpos específicos para *Treponema pallidum* en una muestra aislada en la que un antígeno TpN47 de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 o una combinación o composición de antígenos de acuerdo con la reivindicación 10 se utiliza como reactivo de captura y / o como una pareja de unión para dichos anticuerpos de *Treponema pallidum*.
- 55 12. Un método para detectar anticuerpos específicos para *Treponema pallidum* en una muestra aislada comprendiendo dicho método
  - a) formar una mezcla de inmunorreacción mezclando una muestra de fluido corporal con el antígeno TpN47 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o con una composición de al menos dos antígenos de *Treponema pallidum* de acuerdo con la reivindicación 10
  - b) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un período de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos contra dicho antígeno de *Treponema* o la composición de antígenos de *Treponema* presente en la muestra de fluido corporal inmunorreaccione con dicho antígeno de *Treponema* o la composición de antígenos de *Treponema* para formar un producto de inmunorreacción; y
  - 60 c) detectar la presencia y / o la concentración de cualquiera de dichos productos de inmunorreacción.
- 65 13. El uso de un antígeno TpN47 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o de una composición de antígenos de *Treponema pallidum* de acuerdo con la reivindicación 10 en una prueba de diagnóstico in vitro para la detección de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*.

14. Un equipo de reactivos para la detección de anticuerpos anti-Treponema pallidum, que comprende al menos un antígeno TpN47 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición de antígeno de acuerdo con la reivindicación 10.

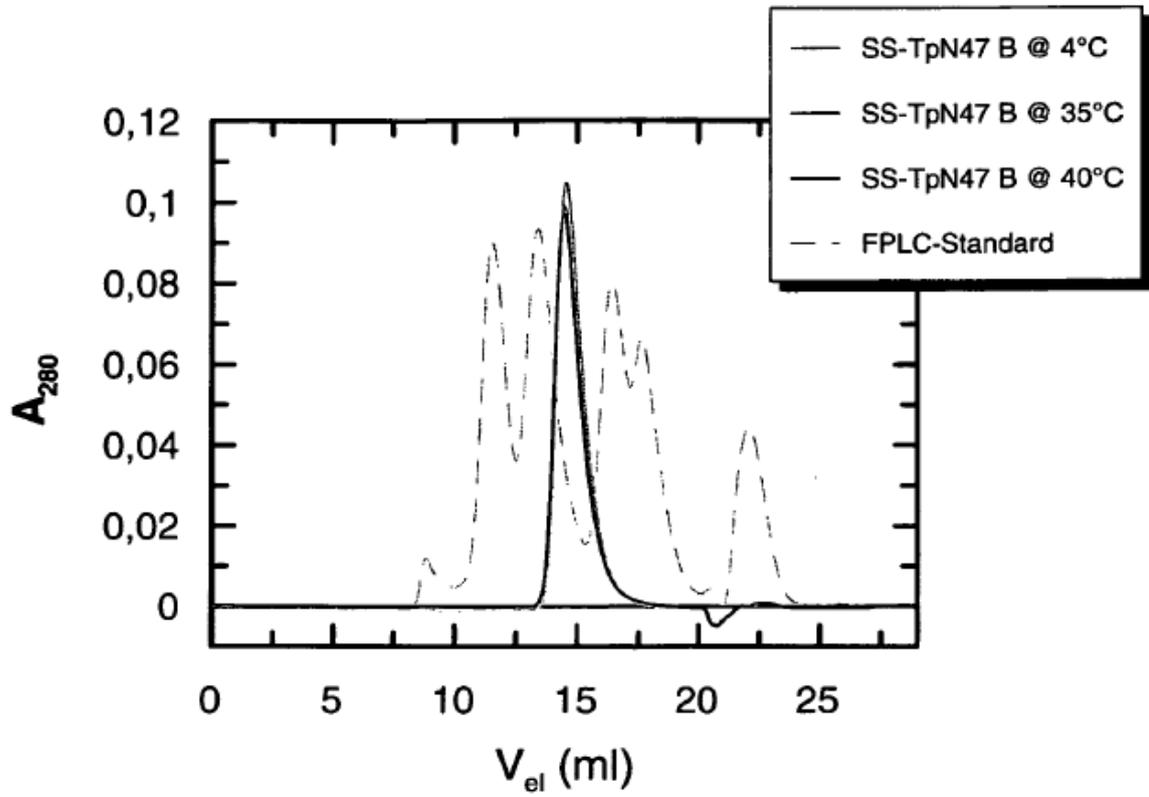


Figura 1/12

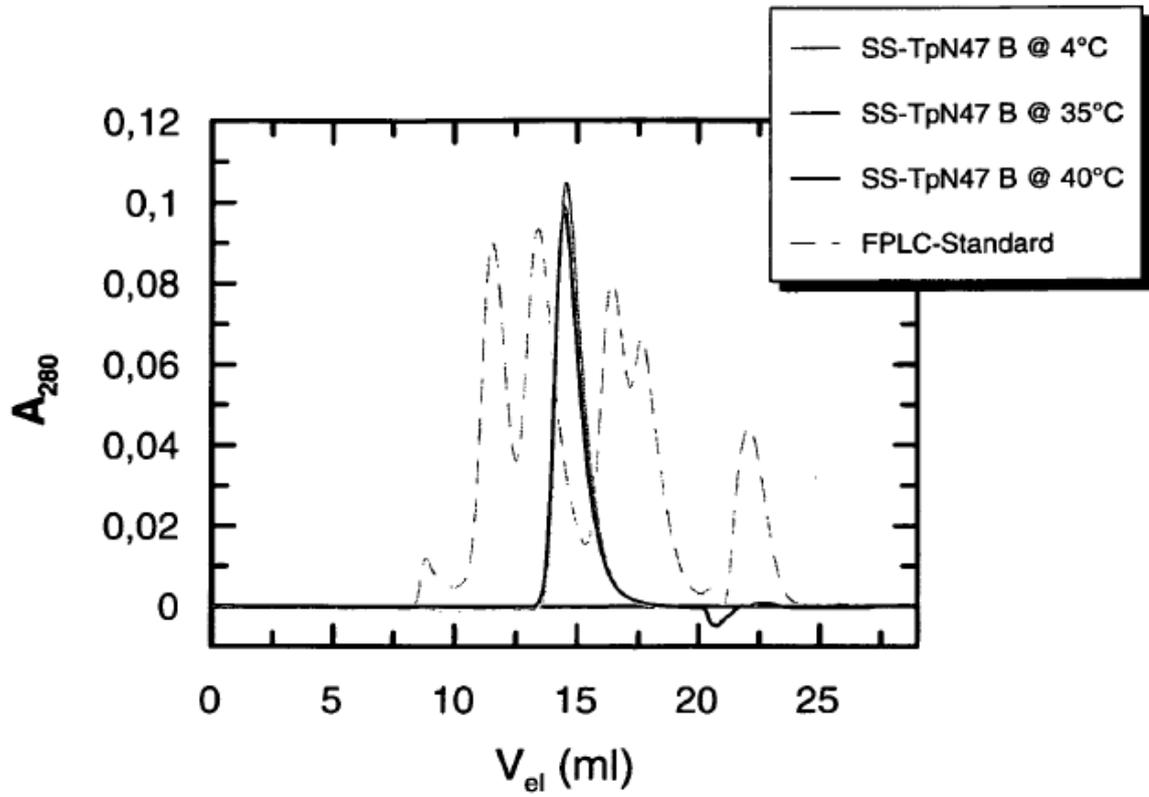


Figura 2/12

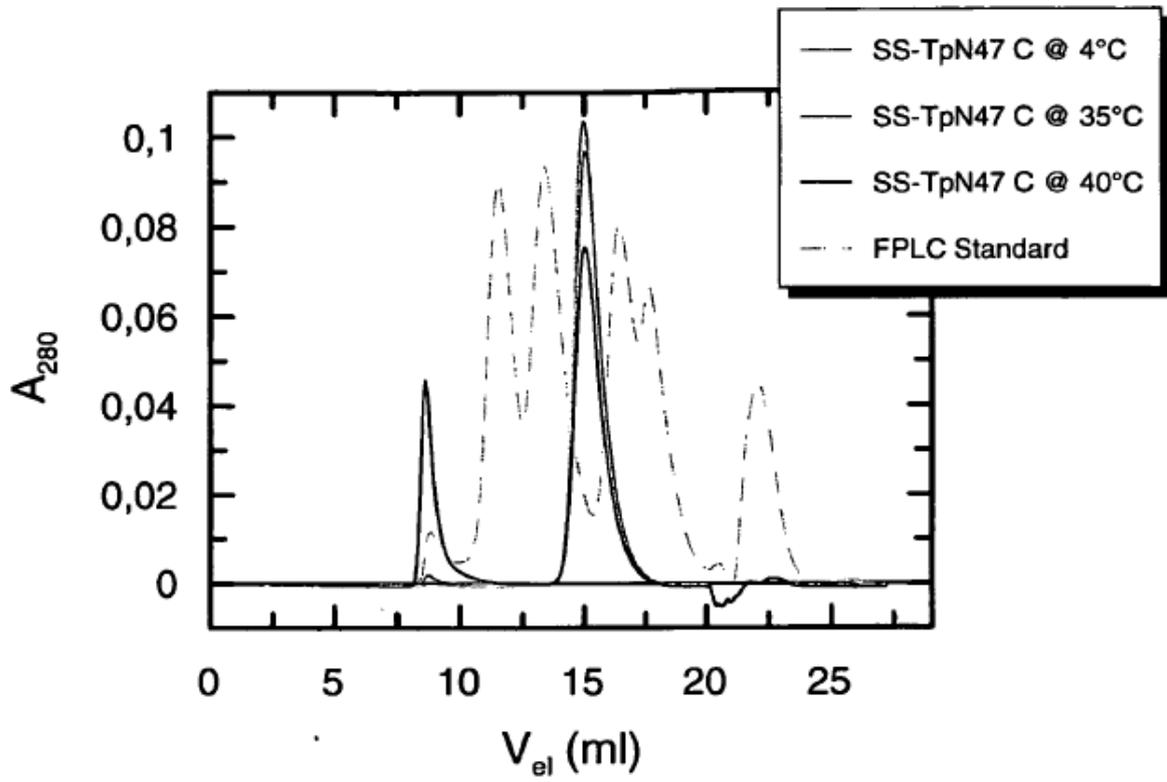


Figura 3/12

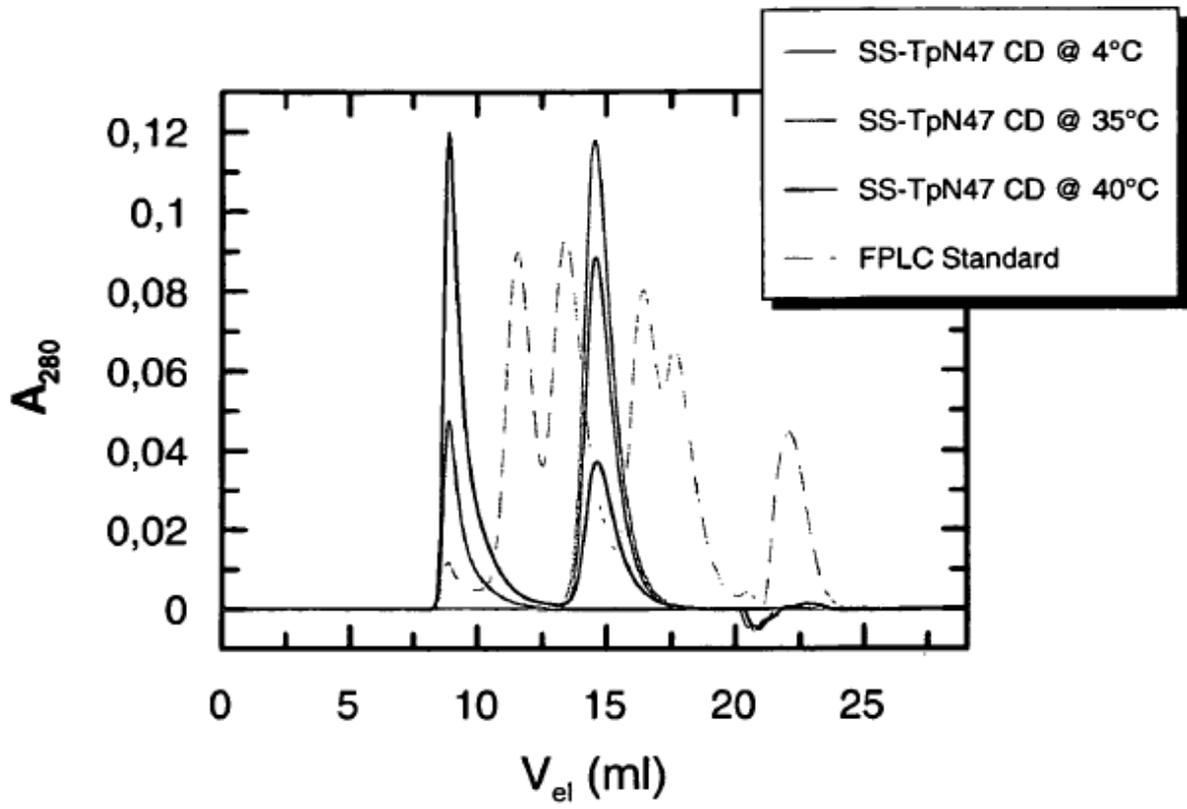


Figura 4/12

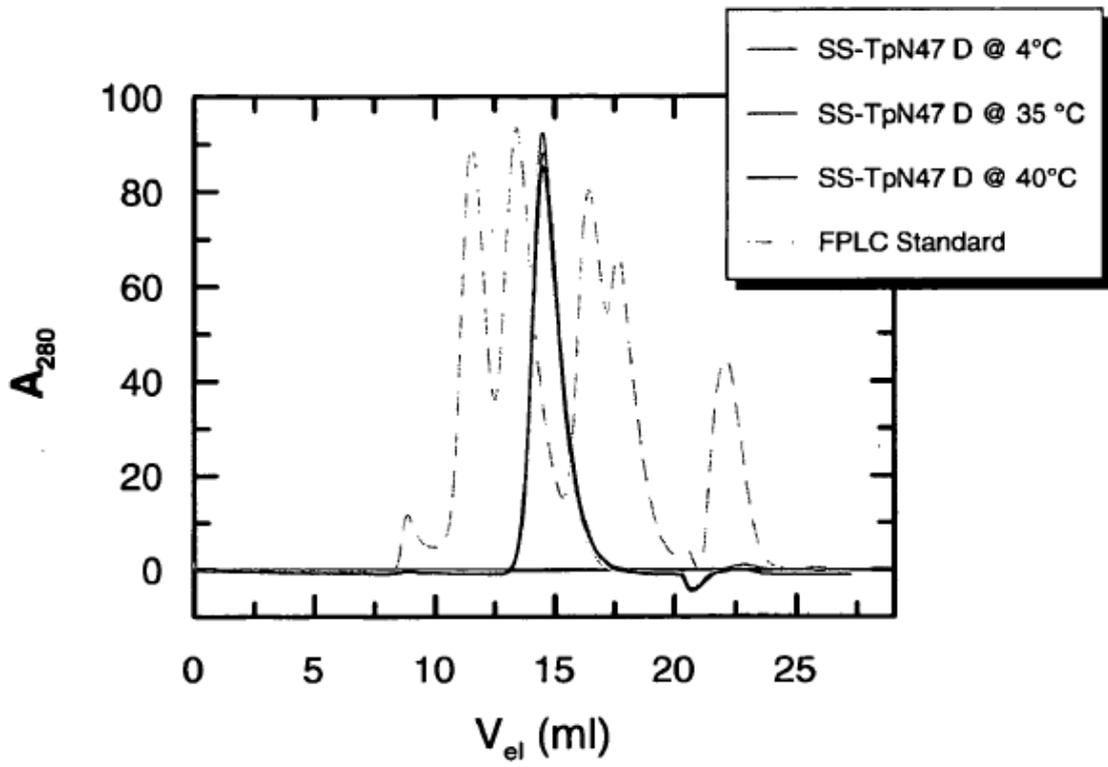


Figura 5/12

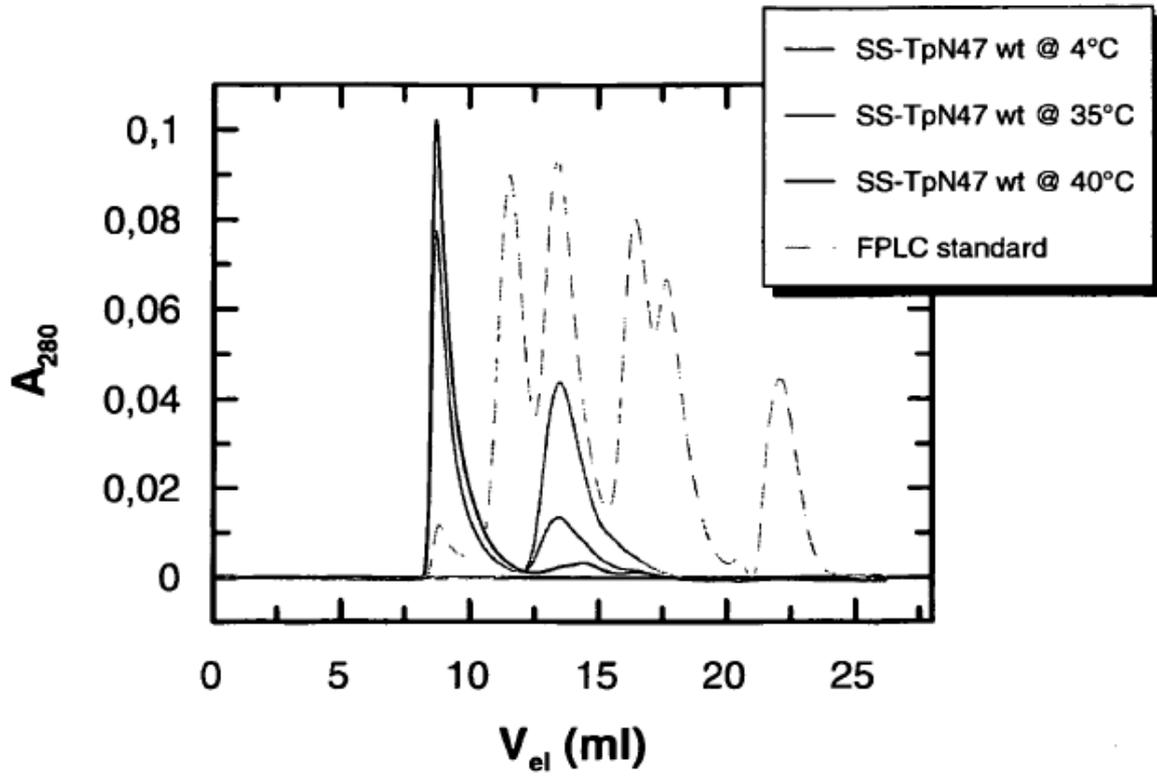


Figura 6/12

Epitope Mapping of TpN47

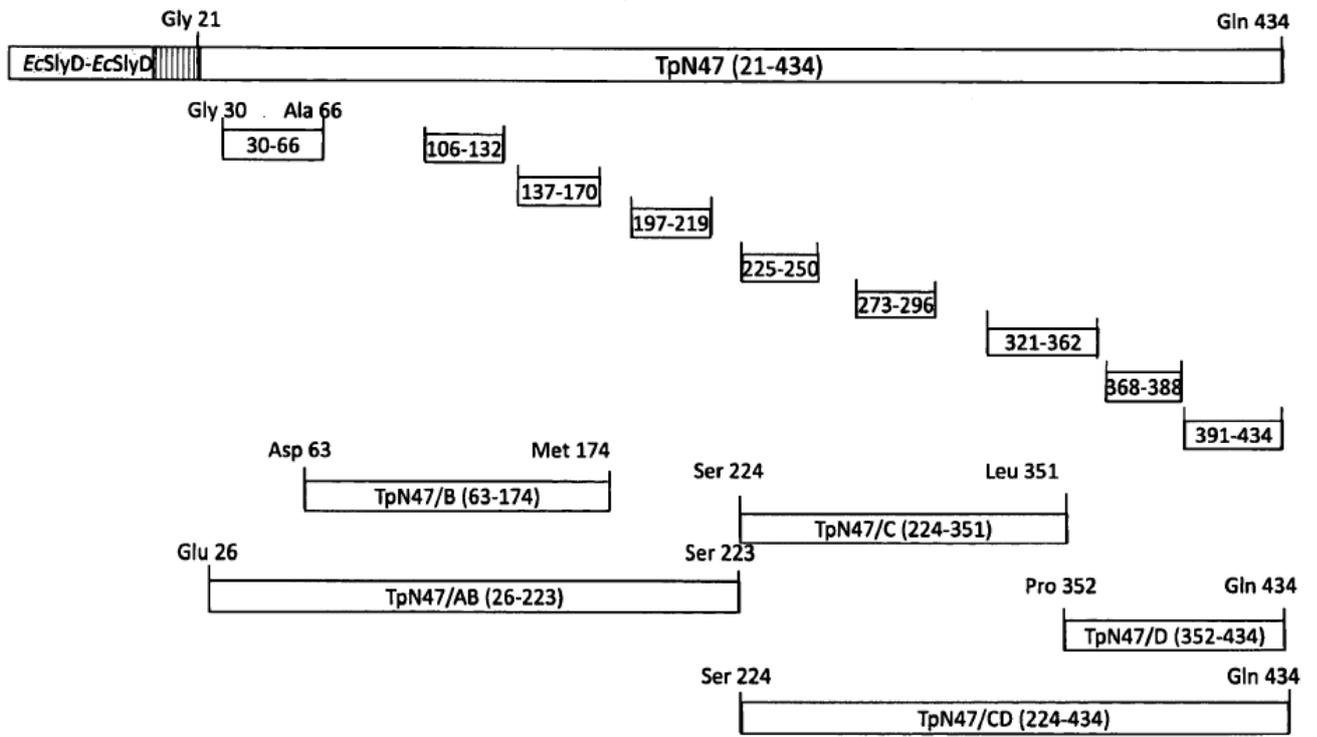


Figura 7/12

Figura 8a/12

Tabla 2

Experimento	1		2		3		10	
R1	rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-	
	TpN47 (30-66)		TpN47 (106-132)		TpN47 (137-170)		TpN47 (21-434)	
Marcaje	Bi(DDS)		Bi(DDS)		Bi(DDS)		Bi(DDS)	
Concentración Bi-conjugado	70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml	
R2	rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-	
	TpN47(30-66)		TpN47(106-132)		TpN47(137-170)		TpN47(21-434)	
Marcaje	BPRu(SK(2)DSS)		BPRu(SK(2)DSS)		BPRu(SK(2)DSS)		BPRu(SK(2)DSS)	
Concentración Ru-conjugado	70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml	
Muestra	Señal	Dinámica de señal	Señal	Dinám. señal	Señal	Dinám. señal	Señal	Dinám. señal
Promedio sueros neg	491	1.00	511	1.00	501	1.00	900	1.00
Donante int. 4320	488	0.99	486	0.95	493	0.98	534	0.59
Donante int. 4321	496	1.01	523	1.02	508	1.01	524	0.58
Donante int. 4322	521	1.06	609	1.19	555	1.11	1,197	1.33
Donante int. 4511	489	1.00	507	0.99	486	0.97	521	0.58
Donante int. 4316	493	1.00	493	0.97	491	0.98	520	0.58
Donante int. 4345	496	1.01	512	1.00	514	1.03	1,321	1.47
Donante int. 4314	468	0.95	476	0.93	486	0.97	602	0.67
Donante int. 4474	473	0.96	487	0.95	485	0.97	543	0.60
Donante int. 4475	492	1.00	513	1.00	504	1.01	2,694	2.99
Donante int. 4476	492	1.00	502	0.98	489	0.98	545	0.61
Syphilis IgG 1209A179	1,543	3.14	524	1.03	520	1.04	91,925	102.13
Syphilis IgG 1209A178	1,220	2.49	511	1.00	524	1.05	10,326	11.47
Syphilis IgG 1209A177	8,601	17.52	962	1.88	794	1.58	200,660	222.93
Syphilis IgG 1209A176	678	1.38	486	0.95	513	1.02	37,500	41.66
Syphilis IgG 1209A174	718	1.46	489	0.96	505	1.01	225,310	250.32
Syphilis IgM 1209A192	8,201	16.71	590	1.16	1,603	3.20	171,322	190.34
Syphilis IgM 1209A191	10,513	21.42	807	1.58	830	1.66	109,434	121.58
Syphilis IgM 1209A188	18,647	37.99	498	0.97	496	0.99	160,090	177.86
Syphilis IgM 1209A167	507	1.03	514	1.01	526	1.05	9,991	11.10
Syphilis IgM 1209A166	62,458	127.26	5,760	11.28	1,700	3.39	164,024	182.23

Figura 8b/12

Tabla 2

Experimento	4		5		6		10	
R1	rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-	
	<b>TpN47 (197-219)</b>		<b>TpN47 (225-250)</b>		<b>TpN47 (273-296)</b>		<b>TpN47 (21-434)</b>	
Marcaje	Bi(DDS)		Bi(DDS)		Bi(DDS)		Bi(DDS)	
Concentración Bi-conjugado	70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml	
R2	rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-	
	<b>TpN47(197-219)</b>		<b>TpN47(225-250)</b>		<b>TpN47(273-296)</b>		<b>TpN47(21-434)</b>	
Marcaje	BPRu(SK(2)DSS)		BPRu(SK(2)DSS)		BPRu(SK(2)DSS)		BPRu(SK(2)DSS)	
Concentración Ru-conjugado	70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml	
Muestra	Señal	Dinámica de señal	Señal	Dinám. señal	Señal	Dinám. señal	Señal	Dinám. señal
Prom. sueros neg	503	1.00	497	1.00	506	1.00	900	1.00
Donante int. 4320	496	0.99	494	0.99	504	1.00	534	0.59
Donante int. 4321	507	1.01	500	1.01	524	1.04	524	0.58
Donante int. 4322	545	1.08	515	1.04	558	1.10	1,197	1.33
Donante int. 4511	497	0.99	493	0.99	512	1.01	521	0.58
Donante int. 4316	487	0.97	496	1.00	487	0.96	520	0.58
Donante int. 4345	516	1.03	511	1.03	512	1.01	1,321	1.47
Donante int. 4314	477	0.95	479	0.96	477	0.94	602	0.67
Donante int. 4474	483	0.96	498	1.00	497	0.98	543	0.60
Donante int. 4475	521	1.04	491	0.99	497	0.98	2,694	2.99
Donante int. 4476	502	1.00	492	0.99	488	0.97	545	0.61
Syphilis IgG 1209A179	508	1.01	510	1.03	515	1.02	91,925	102.13
Syphilis IgG 1209A178	506	1.01	488	0.98	507	1.00	10,326	11.47
Syphilis IgG 1209A177	631	1.25	556	1.12	640	1.27	200,660	222.93
Syphilis IgG 1209A176	503	1.00	495	1.00	508	1.00	37,500	41.66
Syphilis IgG 1209A174	486	0.97	493	0.99	487	0.96	225,310	250.32
Syphilis IgM 1209A192	533	1.06	505	1.02	516	1.02	171,322	190.34
Syphilis IgM 1209A191	643	1.28	616	1.24	564	1.12	109,434	121.56
Syphilis IgM 1209A188	495	0.98	468	0.94	492	0.97	160,090	177.86
Syphilis IgM 1209A167	523	1.04	507	1.02	515	1.02	9,991	11.10
Syphilis IgM 1209A166	985	1.96	769	1.55	1,133	2.24	164,024	182.23

Figura 8c/12

Tabla 2

Experimento	7		8		9		10	
R1	rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-	
	TpN47 (321-362)		TpN47 (368-388)		TpN47 (391-434)		TpN47 (21-434)	
Marcaje	Bi(DDS)		Bi(DDS)		Bi(DDS)		Bi(DDS)	
Concentración Bi-conjugado	70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml	
R2	rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-		rec. EcSlyD-	
	TpN47(321- 362)		TpN47(368- 388)		TpN47(391- 434)		TpN47(21-434)	
Marcaje	BPRu(SK(2)DSS)		BPRu(SK(2)DSS)		BPRu(SK(2)DSS)		BPRu(SK(2)DSS)	
Concentración Ru-conjugado	70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml	
Muestra	Señal	Dinámica de señal	Señal	Dinám. señal	Señal	Dinám. señal	Señal	Dinám. señal
Prom. sueros neg	498	1.00	489	1.00	518	1.00	900	1.00
Donante int. 4320	489	0.98	482	0.99	502	0.97	534	0.59
Donante int. 4321	503	1.01	495	1.01	521	1.01	524	0.58
Donante int. 4322	553	1.11	518	1.06	577	1.11	1,197	1.33
Donante int. 4511	488	0.98	478	0.98	531	1.02	521	0.58
Donante int. 4316	476	0.96	487	1.00	503	0.97	520	0.58
Donante int. 4345	500	1.01	496	1.01	530	1.02	1,321	1.47
Donante int. 4314	478	0.96	473	0.97	485	0.94	602	0.67
Donante int. 4474	491	0.99	490	1.00	514	0.99	543	0.60
Donante int. 4475	495	0.99	478	0.98	503	0.97	2,694	2.99
Donante int. 4476	502	1.01	492	1.01	517	1.00	545	0.61
Syphilis IgG 1209A179	508	1.02	492	1.01	515	0.99	91,925	102.13
Syphilis IgG 1209A178	487	0.98	494	1.01	523	1.01	10,326	11.47
Syphilis IgG 1209A177	635	1.28	556	1.14	845	1.63	200,660	222.93
Syphilis IgG 1209A176	507	1.02	492	1.01	528	1.02	37,500	41.66
Syphilis IgG 1209A174	490	0.98	468	0.96	500	0.96	225,310	250.32
Syphilis IgM 1209A192	498	1.00	485	0.99	576	1.11	171,322	190.34
Syphilis IgM 1209A191	480	0.96	589	1.20	688	1.33	109,434	121.58
Syphilis IgM 1209A188	482	0.97	483	0.99	509	0.98	160,090	177.86
Syphilis IgM 1209A167	506	1.02	514	1.05	531	1.02	9,991	11.10
Syphilis IgM 1209A166	1,282	2.58	720	1.47	1,656	3.20	164,024	182.23

Figura 9/12

Tabla 3

R1: EcSlyD-EcSlyD- [Dominio TpN47]-Biotin	AB (26-223)		B (63-174)		C (224-351)		D (352-434)		CD (224-434)		ABCD (21-434)	
R2: EcSlyD-EcSlyD- [Dominio TpN47]-Ru	AB (26-223)		B (63-174)		C (224-351)		D (352-434)		CD (224-434)		ABCD (21-434)	
Conc. Bi/Ru conjugado	70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml		70 ng/ml	
Muestra	Señal [cts]	Dinám. señal	Señal [cts]	Dinám. señal	Señal [cts]	Dinám. señal	Señal [cts]	Dinám. señal	Señal [cts]	Dinám. señal	Señal [cts]	Dinám. señal
Prom. sueros neg	454		467		594		472		541		515	
Donante int. 4320	453	1.00	476	1.02	580	0.98	477	1.01	529	0.98	518	1.01
Donante int. 4321	463	1.02	476	1.02	608	1.02	482	1.02	551	1.02	528	1.02
Donante int. 4322	468	1.03	476	1.02	623	1.05	481	1.02	557	1.03	525	1.02
Donante int. 4475	449	0.99	467	1.00	588	0.99	471	1.00	542	1.00	519	1.01
Donante int. 4474	444	0.98	465	1.00	591	1.00	459	0.97	551	1.02	519	1.01
Donante int. 4345	465	1.02	455	0.97	574	0.97	509	1.08	538	0.99	508	0.99
Donante int. 4314	449	0.99	455	0.97	596	1.00	448	0.95	527	0.98	494	0.96
Donante int. 4511	452	1.00	466	1.00	594	1.00	470	1.00	537	0.99	507	0.99
Donante int. 4316	447	0.98	460	0.98	588	0.99	456	0.97	534	0.99	503	0.98
Donante int. 4476	453	1.00	478	1.02	596	1.00	462	0.98	540	1.00	527	1.02
Syphilis IgG 1209A179	12,359	27.21	7,615	16.30	596	1.00	11,616	24.63	15,227	28.17	29,592	57.49
Syphilis IgG 1209A178	2,356	5.19	1,393	2.98	596	1.00	850	1.80	1,087	2.01	3,260	6.33
Syphilis IgG 1209A177	60,282	132.72	41,889	89.63	563	0.95	13,094	27.77	17,530	32.43	94,880	184.32
Syphilis IgG 1209A176	8,447	18.60	6,204	13.27	607	1.02	1,773	3.76	2,014	3.73	11,894	23.11
Syphilis IgG 1209A174	44,791	98.61	35,280	75.49	595	1.00	37,192	78.87	48,197	89.15	104,758	203.51
Syphilis IgM 1209A192	75,638	166.53	31,696	67.82	881	1.48	13,250	28.10	26,668	49.33	124,027	240.94
Syphilis IgM 1209A191	121,724	267.99	77,708	166.28	608	1.02	38,260	81.13	58,394	108.01	150,789	292.93
Syphilis IgM 1209A188	45,905	101.07	23,721	50.76	582	0.98	1,569	3.33	2,895	5.36	62,311	121.05
Syphilis IgM 1209A167	1,216	2.68	829	1.77	613	1.03	507	1.08	674	1.25	1,887	3.67
Syphilis IgM 1209A166	162,863	358.57	81,235	173.82	644	1.08	38,163	80.93	58,444	108.11	178,318	346.41

Figura 10/12

Tabla 4

R1	<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47</i> [AB] -Bi					<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47</i> [B] -Bi				
	TpN47 (26-223)					TpN47 (63-174)				
	70ng/ml					70ng/ml				
	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. señal	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. señal
R2	<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47</i> [AB] -Ru					<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47</i> [B] -Ru				
	TpN47 (26-223)					TpN47 (63-174)				
	70ng/ml					70ng/ml				
	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. Señal	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. Señal
cts	SD	cts	SD	cts		SD	cts	SD		
BM 200830	2,859	6.37	2,114	4.67	73.9%	1,571	3.33	1,475	3.15	93.9%
BM 200831	2,892	6.44	2,661	5.88	92.0%	1,862	3.94	1,768	3.78	94.9%
BM 202017	47,659	106	42,159	93.1	88.5%	45,895	97.2	42,945	91.8	93.6%
BM 202018	37,619	83.8	33,297	73.5	88.5%	36,750	77.8	33,793	72.2	92.0%
BM 206252	17,346	38.7	15,372	33.9	88.6%	10,361	21.9	9,617	20.5	92.8%
BM 206253	18,178	40.5	15,656	34.6	86.1%	10,606	22.5	9,763	20.9	92.1%
BM 206254	23,179	51.6	20,424	45.1	88.1%	13,492	28.6	12,700	27.1	94.1%
Trina #097	447	1.00	447	0.987	100%	478	1.01	468	0.999	97.8%
Trina #098	450	1.00	467	1.03	104%	462	0.979	463	0.990	100%
Trina #099	449	1.00	460	1.02	102%	482	1.02	471	1.01	97.6%
Trina #100	450	1.00	437	0.966	97.3%	466	0.987	470	1.01	101%
Promedio negativo	449		453			472		468		

Figura 11/12

Tabla 5

R1	<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47[C] -Bi</i>					<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47[D] -Bi</i>				
	<b>TpN47 (224-351)</b>					<b>TpN47 (352-434)</b>				
	70ng/ml					70ng/ml				
	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. señal	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. señal
cts	SD	cts	SD	cts		SD	cts	SD		
R2	<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47 [C] -Ru</i>					<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47 [D] -Ru</i>				
	<b>TpN47 (224-351)</b>					<b>TpN47 (352-434)</b>				
	70ng/ml					70ng/ml				
	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. Señal	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. Señal
cts	SD	cts	SD	cts		SD	cts	SD		
BM 200830	619	1.01	658	1.03	106%	1,417	3.02	1,424	3.03	100%
BM 200831	618	1.01	665	1.04	108%	1,684	3.59	1,673	3.56	99.3%
BM 202017	643	1.06	660	1.03	103%	5,031	10.7	5,133	10.9	102%
BM 202018	612	1.00	670	1.05	109%	4,009	8.54	4,180	8.91	104%
BM 206252	655	1.07	669	1.05	102%	2,264	4.82	2,370	5.05	105%
BM 206253	624	1.02	659	1.03	106%	2,301	4.90	2,366	5.04	103%
BM 206254	623	1.02	655	1.03	105%	2,733	5.82	2,844	6.06	104%
Trina #097	607	1.00	648	1.01	107%	460	0.98	459	0.98	99.6%
Trina #098	614	1.01	626	0.981	102%	475	1.01	480	1.02	101%
Trina #099	610	1.00	645	1.01	106%	469	1.00	468	1.00	99.7%
Trina #100	608	1.00	635	0.995	104%	472	1.01	471	1.00	99.7%
Promedio negativo	610		638			469		469		

Figura 12/12

Tabla 6

R1	<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47[CD] -Bi</i>					<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47[ABCD] -Bi</i>				
	TpN47 (224-434)					TpN47 (21-434) longitud completa				
	70ng/ml					70ng/ml				
	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. señal	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. señal
R2	<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47[CD] -Ru</i>					<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN47[ABCD] -Ru</i>				
	TpN47 (224-434)					TpN47 (21-434) longitud completa				
	70ng/ml					70ng/ml				
	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. Señal	72h 4°C		72h 42°C		Recuper. Señal
cts	SD	cts	SD	cts		SD	cts	SD		
BM 200830	1,803	3.41	1,442	2.67	80.0%	4,250	8.50	2,217	4.08	52.2%
BM 200831	2,272	4.30	1,775	3.29	78.1%	5,383	10.8	2,609	4.80	48.5%
BM 202017	7,532	14.3	5,116	9.48	67.9%	77,703	155	44,871	82.5	57.7%
BM 202018	5,967	11.3	4,044	7.49	67.8%	62,711	125	36,044	66.3	57.5%
BM 206252	3,531	6.68	2,550	4.72	72.2%	22,806	45.6	10,179	18.7	44.6%
BM 206253	3,465	6.56	2,565	4.75	74.0%	23,101	46.2	10,556	19.4	45.7%
BM 206254	4,231	8.01	2,958	5.48	69.9%	29,093	58.2	13,151	24.2	45.2%
Trina #097	531	1.006	536	0.993	101%	492	0.984	540	0.992	110%
Trina #098	531	1.005	539	0.998	101%	499	0.998	546	1.00	109%
Trina #099	526	0.995	548	1.014	104%	505	1.011	547	1.01	108%
Trina #100	525	0.994	537	0.995	102%	503	1.006	542	0.997	108%
Promedio negativo	528		540			500		544		