(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 590 340**

(51) Int. CI.:

C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2009 E 09006933 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2127679**

(54) Título: **SlpA como herramienta para la tecnología recombinante de proteínas y enzimas**

(30) Prioridad:

26.05.2008 EP 08009537

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2016

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH

(72) Inventor/es:

FAATZ, ELKE;
SCHAARSCHMIDT, PETER;
SCHMITT, URBAN y
SCHOLZ, CHRISTIAN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

SlpA como herramienta para la tecnología recombinante de proteínas y enzimas

La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden un chaperón SlpA y un polipéptido diana, a métodos para expresar recombinantemente, purificar y plegar nuevamente dichas proteínas de fusión, a los usos de las mismas en biotecnología de proteínas y enzimas, y en particular a las aplicaciones de las mismas en el diagnóstico. Además, al invención se refiere a cualquier complejo que comprende SlpA y un polipéptido diana, que esté destinado a incrementar la solubilidad, la actividad, la estabilidad y/o la reversibilidad de plegamiento del polipéptido diana o enzima para aplicaciones biotecnológicas.

Antecedentes de la invención:

El plegamiento de las proteínas es un proceso espontáneo que está controlado por la pequeña diferencia en energía libre de Gibbs entre el estado nativo y el estado no plegado. En el proceso de plegado, una cadena polipeptídica principalmente no estructurada adopta lo que se denomina conformación nativa o estructura tridimensional de la proteína. La agregación de moléculas incompletamente plegadas compite con el plegado productivo, constituyendo un problema importante y afectando a los rendimientos de plegado tanto *in vivo* como *in vitro*. En las células vivas, el plegado está asistido por proteínas ayudante. Los ayudantes de plegado son polipéptidos que asisten en el plegado y mantienen la integridad estructural de otras proteínas. Presentan la capacidad de estimular el plegado correcto de una cadena polipeptídica al interactuar reversiblemente con su diana, evitando de esta manera reacciones secundarias perjudiciales, tal como procesos de agregación. Lo anterior lo llevan a cabo tanto *in vivo* como *in vitro*, y existe un número constantemente creciente de aplicaciones de dichos ayudantes de plegado en los problemas planteados por la biotecnología. Generalmente los ayudantes de plegado se subdividen en catalizadores de plegado y chaperones.

Es conocido que los chaperones se unen reversiblemente a polipéptidos desnaturalizados, parcialmente desnaturalizados o, en términos simples, las superficies hidrofóbicas de los polipéptidos y ayudan de esta manera a renaturalizar las proteínas o a mantenerlas en solución. Los chaperones bajan la concentración de intermediarios de plegado con tendencia a la agregación y de proteínas plegadas con tendencia a la agregación, mediante la unión reversible y el enmascaramiento de las superficies hidrofóbicas. De esta manera ejercen una mera función de unión. En contraste, los catalizadores de plegado, tales como las disulfuro óxidorreductasas y las peptidil-prolil *cis/trans* isomerasas, aceleran las etapas limitantes de la velocidad en el plegado de las proteínas y, de esta manera, acortan la vida de los intermediarios de plegado. De esta manera, los catalizadores de plegado rebajan la concentración de intermediarios de plegado con tendencia a la agregación debido a su función catalítica. Una clase importante de catalizadores de plegado se denomina peptidil-prolil *cis/trans* isomerasas (PPIasas).

Basándose en la similitud de las secuencias, la topología de las proteínas y la unión de moléculas inmunosupresoras, las prolil isomerasas se dividen en tres familias diferentes: las ciclofilinas, las parvulinas y las proteínas de unión a FK506 (de aquí el acrónimo FKBP, por sus siglas en inglés). Las FKBP se unen y resultan inhibidas por FK506, la rapamicina y derivados macrólidos relacionados, los cuales han sido utilizados como fármacos inmunosupresores.

Un ayudante putativo de plegado que pertenece a la familia de FKBP de peptidil-prolil cis/trans isomerasas en *E. coli* es SlpA, siendo SlpA el acrónimo de "SlyD-like proteína A" [proteína A de tipo SlyD] (Hottenrott et al., JBC 272/25:15697-15701, 1997). Actualmente la información sobre SlpA y su función fisiológica en *E. coli* es escasa. Aunque se ha informado de que SlpA presenta una actividad de prolil-isomerasa pobre, hasta hoy esta proteína sigue siendo enigmática. Hasta hoy no se ha dispuesto de información sobre las propiedades físicoquímicas o posibles propiedades de chaperón de SlpA, y la función de SlpA en el citosol de *E. coli* ni siquiera ha sido estudiada.

Suzuki *et al.*(J. Mol. Biol. 328:1149-1160, 2003) describen la estructura tridimensional en solución de una FKBP arqueobacteriana con una doble función, con actividades de peptidil-prolil cis-trans isomerasa y de tipo chaperón, y se proporciona una alineación de la secuencia de aminoácidos de la estructura de dominios para diversas FKBP, entre ellas SlyD y SlpA de *E. coli*. No se han estudiado las aplicaciones diagnósticas de dichas moléculas.

Scholz *et al.*(Biochemistry 45:20-33, 2006) dan a conocer proteínas SlyD de diferentes especies que muestran actividades elevadas de prolil-isomerasa y de chaperón. Se comenta que SlyD, al utilizarla como pareja de fusión, facilita el replegado e incrementa la solubilidad de las proteínas con tendencia a la agregación, tales como el fragmento de ectodominio de gp41 del VIH-1. No se hace mención de SlpA. Scholz *et al.*(Biochemistry 47:4276-4287, 2008) describen la utilización de la renaturalización *in vitro* ayudada por chaperón de una proteína de cubierta E1 manipulada, para la detección de anticuerpos IgG anti-virus de la rubeola. Con este fin se ha utilizado SlyD de *E. coli* como ayudante de plegado. No se describe SlpA.

En muchas aplicaciones diagnósticas se utilizan proteínas producidas recombinantemente a modo de parejas de unión, por ejemplo como antígenos en un inmunoensayo diseñado para la detección de un analito inmunoglobulina específico. Estos antígenos pueden producirse como proteínas de fusión que contienen una parte que constituye la

parte diana o polipeptídico antigénico que se pretende que reconozca y se una a una fracción específica presente en la muestra o en la mezcla de ensayo a estudio. La otra parte de la proteína de fusión producida recombinantemente es una parte polipéptido que se fusiona con la parte antigénica que confiere especificidad, con el fin de facilitar su clonación, expresión, sobreproducción, plegado/replegado y purificación, y para incrementar su solubilidad, su estabilidad o su reversibilidad de plegado. La síntesis de proteínas de fusión producidas recombinantemente se encuentra bien descrita en la técnica anterior. También se encuentra bien establecido que resulta ventajoso utilizar chaperonas como aquella parte de la proteína de fusión que presenta una función como molécula ayudante para la expresión, plegado, purificación, solubilización e incremento de la estabilidad global del polipéptido diana.

La patente US nº 6.207.420 da a conocer un sistema de proteínas de fusión para la expresión de proteínas, en el que las secuencias de aminoácidos de la parte polipéptido diana y la parte péptido fusionado se originan a partir de organismos diferentes. Recientemente ha podido demostrarse que FkpA y SlyD resultan adecuados como módulos de fusión para la producción de proteínas recombinantes. Ambos chaperones incrementan la tasa de expresión de sus proteínas cliente en un huésped procariótico, proporcionan soporte al replegado correcto e incrementan la solubilidad global de proteínas incluso con tendencia extrema a la agregación, tales como las proteínas transmembranales retrovíricas (Scholz et al., JMB 345:1229-1241, 2005, y documento nº WO 03/000877).

Aunque FkpA y SlyD resultan particularmente útiles para ayudar a proteínas difíciles o con tendencia a la agregación a que adopten y mantengan su estructura nativa en reactivos diagnósticos y, más generalmente, en aplicaciones biotecnológicas, sigue existiendo el reto de la estabilidad térmica. La conformación nativa de las proteínas se estabiliza mediante una red cuidadosamente equilibrada de contactos de van-der-Waals, enlaces de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas. Estos contactos están optimizados para el microambiente de la proteína respectiva, y los cambios del pH, fuerza iónica o temperatura perturban y desplazan el equilibrio entre las moléculas plegadas y no plegadas. Un incremento de la temperatura resulta particularmente adecuado para desnaturalizar las proteínas, lo que con frecuencia resulta en la agregación de las moléculas total o parcialmente no plegadas. La agregación térmicamente inducida de las proteínas con la pérdida concomitante de función constituye un problema importante de cualquier formulación de proteínas. Es perfectamente concebible que las temperaturas elevadas o, en términos más generales, el estrés térmico pueda producirse durante el transporte o almacenamiento inapropiado de los reactivos o formulaciones de proteínas.
Un módulo de fusión chaperón, tal como SlyD, por ejemplo, muestra un inicio de desplegado térmicamente inducido a una temperatura de aproximadamente 42ºC, una temperatura que resulta fácilmente excedida, por ejemplo, en el caso de que el sistema de enfriamiento sea defectuoso en un recipiente utilizado para el transporte, envío o almacenamiento de una formulación de proteínas. En el caso de que la proteína diana X sea altamente hidrofóbica y dependa totalmente de la actividad de asistencia de su pareja de fusión, el polipéptido de fusión completo se agregará tan pronto como el módulo SlyD se despliegue y pierda concomitantemente su función solubilizadora. En otras palabras, la estabilidad de SlyD limita la estabilidad global de un polipéptido de fusión SlyD-X en el caso de que X sea una proteína cliente con tendencia a la agregación y muy hidrofóbica.

Las proteínas de fusión que comprenden FkpA muestran una estabilidad ligeramente incrementada, probablemente debido a la termoestabilidad intrínseca más elevada del módulo portador FkpA dimérico. La temperatura de fusión de SlyD de *E. coli* se ha determinado que es de aproximadamente 42ºC, mientras que FkpA es bastante estable hasta aproximadamente 50ºC. Sin embargo, por motivos que se indican de manera general en la sección siguiente, existe la necesidad urgente de proporcionar variantes de chaperón funcional alternativos con una estabilidad intrínseca elevada.

En un inmunoensayo heterogéneo de formato sándwich de doble antígeno (DAGS, por sus siglas en inglés), por ejemplo, se utilizan dos variantes de un antígeno en cada lado del ensayo. Una de estas variantes porta un marcaje con una afinidad elevada para la fase sólida; la otra porta una fracción de señalización con el fin de generar una señal de salida. Cada una de estas variantes de antígeno puede fusionarse con una secuencia ayudante, es decir, un portador o módulo de fusión. Por lo menos un chaperón (o un dominio de unión a polipéptido funcional, es decir, un dominio chaperón) se une o se fusiona con el polipéptido diana y facilita el plegado, incrementa la estabilidad y solubilidad y mantiene el polipéptido diana en una conformación adecuada de manera que el anticuerpo analito que debe determinarse pueda reconocer y unirse específicamente al polipéptido diana. Preferentemente, se utilizan diferentes chaperones como parejas de fusión en cada lado de un ensayo de puente inmunológico, con el fin de romper la simetría inherente del ensayo. Un formato de ensayo que contienen diferentes módulos portadores de fusión pero polipéptidos diana idénticos o similares en cada lado (es decir, en el lado de captura y en el lado de detección) también puede denominarse formato DAGS asimétrico. Mediante la utilización de diferentes módulos de fusión en cada lado de un ensayo DAGS, puede reducirse sustancialmente el riesgo de reacciones cruzadas inmunológicas debidas a los módulos portadores y, concomitantemente, las señales erróneamente elevadas.

Claramente la estabilidad global del ensayo se encuentra limitada por el componente inmunológico con la estabilidad inherente más baja. Al utilizar FkpA y SlyD como parejas de fusión en un DAGS asimétrico, SlyD es la pareja de fusión que limita la estabilidad global. De esta manera, existe una necesidad evidente de encontrar otros chaperones que puedan sustituir totalmente a SlyD funcionalmente y que sean inherentemente más estables frente al estrés térmico. Aunque se ha descrito una multitud de homólogos de SlyD procedentes de organismos termofílicos o hipertermofílicos, existe un problema en la simple utilización de estas proteínas como parejas de fusión: debido a

que han evolucionado y se han optimizado para temperaturas mucho más allá de 60ºC, presentan una estabilidad termodinámica extremadamente elevada. En consecuencia, las proteínas estables e hiperestables con frecuencia tienden a adquirir bastante rigidez a temperatura ambiente, es decir, pierden la flexibilidad, que es un prerrequisito para la unión dinámica a las moléculas diana. Está ampliamente aceptado que la estabilidad de una proteína sólo puede incrementarse a expensas de tanto su flexibilidad como su función, lo que con frecuencia impide la utilización de proteínas altamente estables en aplicaciones a temperatura ambiente. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es identificar los ayudantes de plegado termoestables procedentes de organismos mesofílicos. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar polipéptidos adecuados para aplicaciones diagnósticas y biotecnológicas que presenten una estabilidad térmica incrementada y prolonguen la vida útil de los reactivos diagnósticos y las formulaciones de proteínas.

Unas cuantas proteínas de *E. coli* son estables y solubles a temperaturas muy superiores a 49ºC, tal como se ha informado recientemente en Kwon *et al.*(BMB Reports 41(2):108-111, 2008). Las proteínas que eran solubles con la exposición a temperatura elevada se identificaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. El estudio se llevó a cabo con extractos sonicados de *E. coli* tras la incubación a diversas temperaturas. Entre las 17 proteínas estables frente al calor que se identificaron, 6 proteínas resultaron ser ayudantes putativos de plegado (GroEL, GroES, DnaK, FkpA, factor inductor y los EF-T). Debe indicarse que el experimento se llevó a cabo con un lisado libre de células de *E. coli* y que la solubilidad de la proteína respectiva se consideró el único criterio de estabilidad.

Sin embargo, existe una diferencia sustancial entre la solubilidad y la estabilidad de una proteína. Es bien conocido de la técnica que la solubilidad de una proteína con frecuencia alcanza un mínimo a condiciones de máxima estabilidad. Por ejemplo, la estabilidad termodinámica de una proteína alcanza un máximo en el caso de que el pH de la solución tampón coincida con la pI de la proteína respectiva. Sin embargo, bajo estas mismas condiciones, la solubilidad de la proteína alcanza un mínimo. Otro ejemplo popular es la precipitación a alta concentración salina de las proteínas utilizando sulfato amónico u otros agentes cosmotrópicos: en este caso también la solubilidad de una proteína se reduce a medida que se incrementa su estabilidad (el sulfato amónico es un agente fuertemente cosmotrópico, es decir, estabiliza las estructuras de las proteínas).

El documento nº WO 2007/077008 da a conocer proteínas de fusión quiméricas producidas recombinantemente que contienen el segmento de unión a polipéptido de un chaperón no humano como, por ejemplo, SlyD de *E. coli*, y fusionado N- y C-terminalmente al mismo una peptidil-prolil cis/trans isomerasa de tipo FKBP humana. Se ha dado a conocer un polipéptido de fusión similar utilizando un segmento chaperón de SlpA.

Inesperadamente, SlpA, en particular SlpA de *E. coli*, es capaz de conferir estabilidad térmica a otros polipéptidos diana al utilizarla como pareja de fusión. Tal como informan Hottenrott *et al.*(*supra*) SlpA es un enzima con una actividad de peptidil-prolil cis/trans isomerasa bastante pobre. Inesperadamente, SlpA muestra también características de chaperón pronunciadas y, todavía más inesperadamente, SlpA presenta una elevada estabilidad intrínseca y confiere estabilidad térmica a un polipéptido diana fusionado, provocando de esta manera que el polipéptido diana sea menos susceptible a la agregación inducida por calor. Mientras que el estrechamente relacionado SlyD muestra sólo una estabilidad marginal con un punto medio de desplegado térmico en aproximadamente 42ºC, SlpA conserva su plegado natural por lo menos hasta 50ºC y muestra un punto medio de desplegado térmico (definido como la temperatura de fusión) de aproximadamente 56ºC. En efecto ello resulta sorprendente dada la estrecha relación entre SlyD y SlpA (que representa una proteína de tipo SlyD) y dado el hecho de que ambas son proteínas monoméricas procedentes de un organismo mesofílico tal como *E. coli* con una temperatura de crecimiento máxima de 49ºC. Más inesperadamente, el organismo mesofílico *E. coli* aloja un ayudante de plegado putativo tal como SlpA que combina excelentes características de termoestabilidad y de chaperón.

Descripción resumida de la invención:

La presente invención se refiere a una molécula de ADN recombinante codificante de una proteína de fusión que comprende un chaperón SlpA y un polipéptido diana.

En particular, la invención se refiere a una molécula de ADN recombinante, codificante de una proteína de fusión, que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido diana y cadena arriba o cadena abajo del mismo por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un chaperón proteína A de tipo SlyD (SlpA) de *E. coli* que comprende el segmento de unión a polipéptido o dominio IF de SlpA, en el que las proteínas de unión FK506 (FKBP) se excluyen como polipéptidos diana, y en el que la estabilidad y solubilidad del polipéptido diana fusionado se incrementa bajo condiciones críticas, tales como el estrés térmico, provocando de esta manera que el polipéptido diana resulte menos susceptible a la agregación inducida por calor.

La invención se refiere además a un vector de expresión correspondiente codificante de dicha proteína de fusión, así como células huésped transformadas con dicho vector de expresión. Otro aspecto de la invención es un método para producir dicha proteína de fusión, así como una proteína de fusión producida recombinantemente que comprende un chaperón SlpA y un polipéptido diana tal como se ha definido anteriormente. Un aspecto adicional de la invención es la utilización de la proteína de fusión producida recombinantemente como pareja de unión (tal como

un antígeno, un enzima o un material calibrador recombinante) o como medio para la reducción de interferencias en un inmunoensayo. Además, la invención se refiere a la utilización de la proteína de fusión producida recombinantemente como inmunógeno para la producción de anticuerpos contra el polipéptido diana y a la utilización de la proteína de fusión producida recombinantemente en la producción de una vacuna. Todavía otro aspecto es un método para la detección de un analito en un inmunoensayo que utiliza una proteína de fusión producida recombinantemente, así como un kit de reactivos que contiene una proteína de fusión producida recombinantemente que comprende un chaperón SlpA y un polipéptido diana. Un aspecto adicional se refiere a la utilización de SlpA como medio para la reducción de interferencias y reacciones cruzadas en inmunoensayos. Todavía otro aspecto de la invención es la utilización de complejos solubles y funcionales que comprenden SlpA y una proteína diana destinada a aplicaciones biotecnológicas, en el que la proteína diana puede presentar valor terapéutico o diagnóstico.

Breve descripción de las figuras:

Figura 1: Espectro CD de UV próximo de SlpA de *E. coli*. El espectro se registró en un espectropolarímetro Jasco-720 en un soporte para celdas termostatizado a 20ºC. La concentración de proteína era de 417 µM en una cubeta de 1 cm. El tampón era fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM. La anchura de banda era de 2 nm, la resolución era de 0,5 nm, la velocidad de escaneo era de 50 nm/min. a una respuesta de 2 s. Los espectros se registraron 9 veces y se promediaron con el fin de mejorar la proporción de señal a ruido. La señal se convirtió en elipticidad residual media (expresada en deg cm^2 $dmol^{-1}$). El espectro apunta a una proteína plegada de tipo nativo; el máximo de la señal se encuentra en 262 nm.

Figura 2: espectro CD de UV próximo de SlyD de *E. coli*. El espectro se registró en un espectropolarímetro Jasco-720 en un soporte para celdas termostatizado a 20ºC. La concentración de proteína era de 200 µM en una cubeta de 1 cm. El tampón era fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM. La anchura de banda era de 2 nm, la resolución era de 0,5 nm, la velocidad de escaneo era de 50 nm/min. a una respuesta de 1 s. Los espectros se registraron 9 veces y se promediaron con el fin de mejorar la proporción de señal a ruido. La señal se convirtió en elipticidad residual media (expresada en deg cm^2 $dmol^{-1}$). El espectro de SlyD difiere significativamente del espectro de SlpA. Apunta a una proteína plegada de tipo nativo; el máximo de la señal se encuentra en 275 nm.

Figura 3: transiciones de desplegado inducidas térmicamente de SlyD y SlpA tal como se monitorizan mediante CD de UV próximo a 275 nm (SlyD) y a 262 nm (SlpA). Las curvas de fusión se normalizaron respecto a la fracción de moléculas nativas El desplegado de tanto SlyD como SlpA es totalmente reversible y la señal de CD de UV próximo de las moléculas nativas puede restaurarse totalmente tras la transición térmica una vez la muestra se ha enfriado hasta la temperatura ambiente. La temperatura de fusión (es decir, la temperatura a la que el 50% de las moléculas se encuentran plegadas y el 50%, no plegadas) es de 42ºC para SlyD y de 56ºC para SlpA. La figura 3 ilustra claramente la superior estabilidad térmica de SlpA.

Figura 4: el espectro CD de UV próximo de la proteína de fusión SlpA-gp41. El espectro se registró en un espectropolarímetro Jasco-720 en un soporte para celdas termostatizado a 20ºC. La concentración de proteína era de 18,7 µM en una cubeta de 1 cm. El tampón era fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM. La anchura de banda era de 2,0 nm, la resolución era de 0,5 nm, la velocidad de escaneo era de 50 nm/min. a una respuesta de 2 s. Los espectros se registraron 9 veces y se promediaron con el fin de mejorar la proporción de señal a ruido. La señal se convirtió en elipticidad residual media (expresada en deg cm^2 $dmol^{-1}$). El espectro apunta a una proteína de plegado similar al nativo. El mínimo de señal a 293 es indicativo de un fragmento de ectodominio gp41 de plegado similar al antivo, que es rico en residuos de triptófano y absorbe luz más allá de 280 nm. La firma en aproximadamente 290 nm apunta inequívocamente a un plegado similar al nativo de la fracción gp41 dentro del polipéptido de fusión SlpA-gp41.

Figura 5: espectro CD de UV próximo de la proteína de fusión SlyD-gp41. El espectro se registró en un espectropolarímetro Jasco-720 en un soporte para celdas termostatizado a 20ºC. La concentración de proteína era de 14,4 µM en una cubeta de 1 cm. El tampón era fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM. La anchura de banda era de 2,0 nm, la resolución era de 0,5 nm, la velocidad de escaneo era de 50 nm/min. a una respuesta de 2 s. Los espectros se registraron 9 veces y se promediaron con el fin de mejorar la proporción de señal a ruido. La señal se convirtió en elipticidad residual media (expresada en deg cm^2 $dmol^{-1}$). El mínimo de señal a 293 es indicativo de un fragmento de ectodominio gp41 de plegado similar al nativo, que es rico en residuos de triptófano y absorbe luz más allá de 280 nm. La firma en aproximadamente 290 nm apunta fuertemente a un plegado similar al nativo de la fracción gp41 dentro del polipéptido de fusión SlyD-gp41.

Figura 6 A/B: se realizó un seguimiento del plegado inducido térmicamente de SlyD-gp41 (A) y SlpA-gp41 (B) mediante la reducción de la señal de dicroísmo circular a 270 nm. El desplegado de la pareja de fusión chaperón respectivo se produce concurrentemente con la pérdida de su capacidad de solubilización y conduce a la agregación espontánea de la fracción extremadamente hidrofóbica gp41. El inicio de agregación se produce a aproximadamente 40ºC para SlyD-gp41 y a aproximadamente 56ºC para SlpA-gp41. La elipticidad se expresa en

miligrados (mdeg); los límites de temperatura críticos más allá de los cuales se produce la agregación (irreversible) se subrayan en línea discontinua.

Figura 7: transición de desplegado inducida térmicamente de SlyD-gG1 (26-189) monitorizada por el CD de UV próximo a 280 nm. La elipticidad de la proteína de fusión como función de la temperatura se expresa en miligrados (mdeg). El desplegado de SlyD-gG1 (26-189) es en gran medida reversible y la señal de CD de UV próximo del polipéptido de fusión nativo se restaura en gran medida una vez la muestra se ha enfriado hasta la temperatura ambiente. La temperatura de fusión (es decir, la temperatura a la que el 50% de las moléculas se encuentran plegadas y el 50%, no plegadas) de SlyD-gG1 (26-189) es de aproximadamente 53ºC.

Figura 8: transición de desplegado inducida térmicamente de SlpA-gG1 (26-189) monitorizada por el CD de UV lejano a 220 nm. La elipticidad de la proteína de fusión como función de la temperatura se expresa en miligrados (mdeg). El desplegado de SlyD-gG1 (26-189) es en gran medida reversible y la señal de CD de UV lejano del polipéptido de fusión nativo se restaura en gran medida una vez la muestra se ha enfriado hasta la temperatura ambiente. La temperatura de fusión (es decir, la temperatura a la que el 50% de las moléculas se encuentran plegadas y el 50%, no plegadas) de SlpA-gG1 (26-189) es de aproximadamente 63ºC. Lo anterior ilustra claramente la estabilidad térmica superior de SlpA-gG1 (26-189) en comparación con SlyD-gG1 (26-189).

Figura 9: reactividad inmunológica de SlpA-gG1 (26-189) y de SlyD-gG1 (26-189) con sueros humanos positivos para anti-VHS-1 y negativos para anti-VHS-1 en un analizador automático Elecsys® tal como se indica en el Ejemplo 4. La Tabla 1 demuestra el rendimiento de ambas variantes de antígeno antes y después de un tratamiento térmico severo durante la noche a 60ºC. El resultado de los experimentos demuestra claramente la superioridad de SlpA-gG1 (26-189) bajo estrés térmico en comparación con SlyD-gG1 (26-189) bajo estrés térmico de dos maneras diferentes. En primer lugar, la recuperación de la señal con sueros positivos para anti-VHS-1 (mitad superior de la Tabla 1) era significativamente superior con el polipéptido de fusión de SlpA sometido a estrés térmico. En segundo lugar, el incremento de la señal de fondo con sueros negativos para anti-VHS-1 (mitad inferior de la Tabla 1) era significativamente inferior con el polipéptido de fusión de SlpA sometido a estrés térmico. Ambos efectos mejoran la dinámica de la señal del inmunoensayo y subrayan las ventajas de SlpA como pareja de fusión que confiere estabilidad y solubilidad para proteínas diana difíciles. De esta manera, puede garantizarse la sensibilidad del inmunoensayo, mediante la utilización de SlpA como pareja de fusión en lugar del estrechamente relacionado SlyD.

Breve descripción del listado de secuencias:

SEC ID nº 1 muestra la secuencia de aminoácidos completa (149 aminoácidos) de SlpA de *E. coli*, obtenida de la base de datos SwissProt nº de acceso P0AEM0:

MSESVQSNSA VLVHFTLKLD DGTTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK

TTFSLEPDAA FGVPSPDLIQ YFSRREFMDA GEPEIGAIML FTAMDGSEMP GVIREINGDS

ITVDFNHPLA GQTVHFDIEV LEIDPALEA

La SEC ID nº 2 muestra la secuencia de aminoácidos de SlpA de *E. coli* (aminoácidos serina 2 a ácido glutámico 148) tal como se utiliza en la sección de Ejemplos. La metionina N-terminal se elimina cotraduccionalmente en *E. coli*. Para facilitar la clonación, también se ha eliminado la alanina C-terminal. Además, se ha añadido una etiqueta hexa-histidina C-terminal para facilitar la purificación y nuevo plegado de la proteína:

SESVQSNSAV LVHFTLKLDD GTTAESTRNN GKPALFRLGD ASLSEGLEQH LLGLKVGDKT

TFSLEPDAAF GVPSPDLIQY FSRREFMDAG EPEIGAIMLF TAMDGSEMPG VIREINGDSI

TVDFNHPLAG QTVHFDIEVL EIDPALEHHH HHH

La SEC ID nº 3 muestra la secuencia de aminoácidos de SlpA-gp41 de *E. coli*. La parte gp41 contiene los aminoácidos 536 a 681 de gp41 del VIH 1, la parte SlpA contiene los aminoácidos 1 a 146. La secuencia porta una etiqueta hexa-histidina C-terminal que ha sido añadida para facilitar la purificación y nuevo plegado de la proteína de fusión.

MSESVQSNSA VLVHFTLKLD DGTTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK

TTFSLEPDAA FGVPSPDLIQ YFSRREFMDA GEPEIGAIML FTAMDGSEMP GVIREINGDS

ITVDFNHPLA GQTVHFDIEV LEIDPAGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGT LTVQARQLLS

GIVQQQNNEL RAIEAQQHLE QLTVWGTKQL QARELAVERY LKDQQLLGIW GCSGKLICTT

AVPWNASWSN KSLEQIWNNM TWMEWDREIN NYTSLIHSLI EESQNQQEKN EQELLELDKW

ASLWNWFNIT NWLWYLEHHH HHH

La SEC ID nº 4 muestra la secuencia de aminoácidos de SlpA-SlpA-gp41 de *E. coli*. Se han unido dos unidades de SlpA al ectodominio de gp41 del VIH, que constituye un polipéptido diana con fuerte tendencia a la agregación. La

primera unidad SlpA comprende los aminoácidos 1 a 146, la segunda unidad SlpA comprende los aminoácidos 2 a 149 (ambas variantes de SlpA son totalmente equivalentes en términos de función y estabilidad). Se ha añadido una etiqueta hexa-histidina C-terminal para facilitar la purificación y nuevo plegado de la proteína de fusión.

MSESVQSNSA VLVHFTLKLD DGTTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK

TTFSLEPDAA FGVPSPDLIQ YFSRREFMDA GEPEIGAIML FTAMDGSEMP GVIREINGDS

ITVDFNHPLA GQTVHFDIEV LEIDPAGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS ESVQSNSAVL

VHFTLKLDDG TTAESTRNNG KPALFRLGDA SLSEGLEQHL LGLKVGDKTT FSLEPDAAFG

VPSPDLIQYF SRREFMDAGE PEIGAIMLFT AMDGSEMPGV IREINGDSIT VDFNHPLAGQ

TVHFDIEVLE IDPALEAGGG SGGGSGGGSG GGSGGGSGGG TLTVQARQLL SGIVQQQNNE

LRAIEAQQHL EQLTVWGTKQ LQARELAVER YLKDQQLLGI WGCSGKLICT TAVPWNASWS

NKSLEQIWNN MTWMEWDREI NNYTSLIHSL IEESQNQQEK NEQELLELDK WASLWNWFNI

TNWLWYLEHH HHHH

La SEC ID nº 5 muestra la secuencia de aminoácidos de SlyD-gp41 de *E. coli*. Se ha añadido una etiqueta hexa-histidina C-terminal para facilitar la purificación y nuevo plegado *in vitro* de la proteína.

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV

AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD

GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GGSGGGSGGG

SGGGSGGGTL TVQARQLLSG IVQQQNNELR AIEAQQHLEQ LTVWGTKQLQ ARELAVERYL

KDQQLLGIWG CSGKLICTTA VPWNASWSNK SLEQIWNNMT WMEWDREINN YTSLIHSLIE

ESQNQQEKNE QELLELDKWA SLWNWFNITN WLWYLEHHHH HH

La SEC ID nº 6 muestra la secuencia de aminoácidos de SlyD-SlyD-gp41 de *E. coli*. Las dos unidades SlyD se encuentran fusionados con el polipéptido diana gp41. Se ha añadido una etiqueta hexa-histidina C-terminal para facilitar la purificación y nuevo plegado *in vitro* de la proteína.

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV

AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD

GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GGSGGGSGGG

SGGGSGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE

VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE

DDHVVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHHDHD HDGGGSGGGS

GGGSGGGSGG GSGGGTLTVQ ARQLLSGIVQ QQNNELRAIE AQQHLEQLTV WGTKQLQARE

LAVERYLKDQ QLLGIWGCSG KLICTTAVPW NASWSNKSLE QIWNNMTWME WDREINNYTS

LIHSLIEESQ NQQEKNEQEL LELDKWASLW NWFNITNWLW YHGHDHDHDH HHHHH

La SEC ID nº 7 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión SlpA-gG1. Se ha fusionado una unidad S_lpA al polipéptido diana gG1, que contiene los aminoácidos 26 a 189 del antígeno gG1 del virus herpes simplex humano VHS-1 tal como se utiliza en el Ejemplo 4.

MSESVQSNSA VLVHFTLKLD DGTTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK

TTFSLEPDAA FGVPSPDLIQ YFSRREFMDA GEPEIGAIML FTAMDGSEMP GVIREINGDS

ITVDFNHPLA GQTVHFDIEV LEIDPALEGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GPTNVSSTTQ

PQLQTTGRPS HEAPNMTQTG TTDSPTAISL TTPDHTPPMP SIGLEEEEEE EGAGDGEHLE

GGDGTRDTLP QSPGPAFPLA EDVEKDKPNR PVVPSPDPNN SPARPETSRP KTPPTIIGPL

ATRPTTRLTS KGRPLVPTPQ HTPLFSFLTA SPALDLEHHH HHH

La SEC ID nº 8 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión SlyD-gG1. Se ha fusionado una unidad SlyD al polipéptido diana gG1, que contiene los aminoácidos 26 a 189 del antígeno gG1 del virus herpes simplex humano VHS-1 tal como se utiliza en el Ejemplo 4.

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV

AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD

GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GGSGGGSGGG

SGGGSGGGPT NVSSTTQPQL QTTGRPSHEA PNMTQTGTTD SPTAISLTTP DHTPPMPSIG

LEEEEEEEGA GDGEHLEGGD GTRDTLPQSP GPAFPLAEDV EKDKPNRPVV PSPDPNNSPA

RPETSRPKTP PTIIGPLATR PTTRLTSKGR PLVPTPQHTP LFSFLTASPA LDLEHHHHHH

La SEC ID nº 9 muestra la secuencia de aminoácidos de SlyD de *Pasteurella multocida* (longitud completa) según SwissProt ID nº Q9CKP2.

MKIAKNVVVS IAYQVRTEDG VLVDEAPVNQ PLEYLQGHNN LVIGLENALE GKAVGDKFEV

RVKPEEAYGE YNENMVQRVP KDVFQGVDEL VVGMRFIADT DIGPLPVVIT EVAENDVVVD

GNHMLAGQEL LFSVEVVATR EATLEEIAHG HIHQEGGCCG GHHHDSDEEG HGCGCGSHHH

HEHEHHAHDG CCGNGGCKH

La SEC ID nº 10 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de SlyD de *Pasteurella multocida* sin cisteínas truncada C-terminalmente que se utiliza preferentemente como unidad chaperón en una proteína de fusión para la utilización en un inmunoensayo de tipo sándwich de doble antígeno (PmS SlyD 1-156):

MKIAKNVVVS IAYQVRTEDG VLVDEAPVNQ PLEYLQGHNN LVIGLENALE GKAVGDKFEV

RVKPEEAYGE YNENMVQRVP KDVFQGVDEL VVGMRFIADT DIGPLPVVIT EVAENDVVVD

GNHMLAGQEL LFSVEVVATR EATLEEIAHG HIHQEG

La SEC ID nº 11 muestra la secuencia de aminoácidos de FkpA de *E. coli* (longitud completa) según SwissProt ID nº P45523:

MKSLFKVTLL ATTMAVALHA PITFAAEAAK PATAADSKAA FKNDDQKSAY ALGASLGRYM

ENSLKEQEKL GIKLDKDQLI AGVQDAFADK SKLSDQEIEQ TLQAFEARVK SSAQAKMEKD

AADNEAKGKE YREKFAKEKG VKTSSTGLVY QVVEAGKGEA PKDSDTVVVN YKGTLIDGKE

FDNSYTRGEP LSFRLDGVIP GWTEGLKNIK KGGKIKLVIP PELAYGKAGV PGIPPNSTLV

FDVELLDVKP APKADAKPEA DAKAADSAKK

La SEC ID nº 12 muestra la parte de secuencia de aminoácidos de FkpA de *E. coli* que se utiliza preferentemente como unidad chaperón en una proteína de fusión para la utilización en un inmunoensayo de tipo sándwich de doble antígeno. La secuencia no presenta la secuencia de señal N-terminal (residuos aminoácidos 1 a 25) y corresponde esencialmente a FkpA madura (FkpA 26-270):

AEAAKPATAA DSKAAFKNDD QKSAYALGAS LGRYMENSLK EQEKLGIKLD KDQLIAGVQD

AFADKSKLSD QEIEQTLQAF EARVKSSAQA KMEKDAADNE AKGKEYREKF AKEKGVKTSS

TGLVYQVVEA GKGEAPKDSD TVVVNYKGTL IDGKEFDNSY TRGEPLSFRL DGVIPGWTEG

LKNIKKGGKI KLVIPPELAY GKAGVPGIPP NSTLVFDVEL LDVKPAPKAD AKPEADAKAA

DSAKK

La SEC ID nº 13 muestra la secuencia de aminoácidos del antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (antígeno nuclear 1 del VEB o EBNA-1) entre las posiciones 401 y 641 (VEB-VHH=virus herpes humano 4); cepa B95-8. La secuencia de aminoácidos completa de EBNA-1 consiste de 641 residuos y se encuentra accesible en SwissProt ID nº P03211. Los residuos cisteína naturales son dispensables para la antigenicidad de EBNA-1 y han sido modificados por alanina (subrayada) con el fin de simplificar el procedimiento de producción e incrementar el rendimiento de proteína soluble plegada similar a la nativa.

GRRPFFHPVG EADYFEYHQE GGPDGEPDVP PGAIEQGPAD DPGEGPSTGP RGQGDGGRRK

KGGWFGKHRG QGGSNPKFEN IAEGLRALLA RSHVERTTDE GTWVAGVFVY GGSKTSLYNL

RRGTALAIPQ ARLTPLSRLP FGMAPGPGPQ PGPLRESIVA YFMVFLQTHI FAEVLKDAIK

DLVMTKPAPT ANIRVTVASF DDGVDLPPWF PPMVEGAAAE GDDGDDGDEG GDGDEGEEGQ E

La SEC ID nº 14 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína p18 del virus de Epstein-Barr, aminoácidos 1 a 176 (marco de lectura abierta BFRF3, VHH-4/B95-8) según SwissProt ID nº P14348. El residuo de cisteína natural en la posición aminoácida 56 es dispensable para la antigenicidad de p18 del VEB y ha sido modificado por alanina

(subrayada) con el fin de simplificar el procedimiento de producción e incrementar el rendimiento de proteína soluble plegada similar a la nativa.

MARRLPKPTL QGRLEADFPD SPLLPKFQEL NQNNLPNDVF REAQRSYLVF LTSQFAYEEY

VQRTFGVPRR QRAIDKRQRA SVAGAGAHAH LGGSSATPVQ QAQAAASAGT GALASSAPST

AVAQSATPSV SSSISSLRAA TSGATAAASA AAAVDTGSGG GGQPHDTAPR GARKKQ

La SEC ID nº 15 muestra la secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de la proteína p18 del virus de Epstein-Barr, aminoácidos 105 a 176 (marco de lectura abierta BFRF3, VHH-4/B95-8) según SwissProt ID nº P14348.

AASAGTGALA SSAPSTAVAQ SATPSVSSSI SSLRAATSGA TAAASAAAAV DTGSGGGGQP

HDTAPRGARK KQ

La SEC ID nº 16 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína p23 del virus de Epstein-Barr, aminoácidos 1 a 162 (marco de lectura abierta BLRF2, VHH-4/B95-8) según SwissProt ID nº P03197. El residuo de cisteína natural en la posición aminoácida 46 es dispensable para la antigenicidad de p23 del VEB y ha sido modificado por alanina (subrayada) con el fin de simplificar el procedimiento de producción e incrementar el rendimiento de proteína soluble plegada similar a la nativa.

MSAPRKVRLP SVKAVDMSME DMAARLARLE SENKALKQQV LRGGAAASST SVPSAPVPPP

EPLTARQREV MITQATGRLA SQAMKKIEDK VRKSVDGVTT RNEMENILQN LTLRIQVSML

GAKGQPSPGE GTRPRESNDP NATRRARSRS RGREAKKVQI SD

La SEC ID nº 17 muestra la secuencia del péptido conector rico en glicinas L=$(GGGS)_5$GGG tal como se utiliza y se muestra en el Ejemplo 1 para la clonación de los casetes de expresión que comprenden SlpA y un polipéptido diana.

GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGG

Descripción detallada de la invención:

Un aspecto de la presente invención es una molécula de ADN recombinante, codificante de una proteína de fusión, que comprende operablemente ligada, por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido diana y cadena arriba o cadena abajo de la misma, por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de una unidad chaperón SlpA.

La invención se refiere a una molécula de ADN recombinante, codificante de una proteína de fusión, que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido diana y cadena arriba o cadena abajo del mismo por lo menos un chaperón proteína A de tipo SlyD (SlpA) de *E. coli* que comprende el segmento de unión a polipéptido o dominio IF de SlpA, en el que las proteínas de unión FK506 (FKBP) se excluyen como polipéptidos diana, y en el que la estabilidad y solubilidad del polipéptido diana fusionado se incrementa bajo condiciones críticas, tales como el estrés térmico, provocando de esta manera que el polipéptido diana resulte menos susceptible a la agregación inducida por calor.

La invención se refiere además a una proteína de fusión producida recombinantemente que comprende por lo menos una secuencia polipeptídica que corresponde al chaperón proteína A de tipo SlyD (SlpA) de *E. coli* que comprende el segmento de unión a polipéptido o el dominio IF de SlpA, y por lo menos una secuencia polipeptídica correspondiente a un polipéptido diana en el que las proteínas de unión FK506 (FKBP) se excluyen como polipéptidos diana, y en el que la estabilidad y solubilidad del polipéptido diana fusionado se incrementa bajo condiciones críticas, tales como el estrés térmico, provocando de esta manera que el polipéptido diana resulte menos susceptible a la agregación inducida por calor.

La expresión "molécula de ADN recombinante" se refiere a una molécula de ADN que se construye mediante la combinación de dos segmentos de secuencia de otra manera separados mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de polinucleótidos mediante técnicas de ingeniería genética o mediante síntesis química. De acuerdo con lo anterior pueden unirse entre sí segmentos polinucleótidos de funciones deseadas para generar una combinación deseada de funciones.

Las secuencias polinucleótidas se unen operablemente al situarse en una relación funcional mutua. Por ejemplo, un promotor se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que el promotor incremente la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, operablemente ligado se refiere a que las secuencias ligadas son continuas, en caso necesario para ligar dos regiones codificantes de proteína, tanto contiguas como en el mismo marco de lectura. Sin embargo, es bien conocido que determinados elementos genéticos, tales como intensificadores, pueden ligarse operablemente incluso a distancia, es decir, aunque no sean contiguos.

Las expresiones "cadena arriba" y "cadena abajo" se definen funcionalmente y se refieren a la dirección o polaridad de una cadena de secuencia de nucleótidos codificante. La dirección de "cadena arriba" se refiere a que el nucleótido se encuentra situado en dirección 5' de una secuencia polinucleótida dada, es decir, hacia el nucleótido

inicial. En términos de la secuencia de aminoácidos, la expresión "cadena arriba" se traduce en que un aminoácido se encuentra situado en dirección N-terminal, es decir, hacia el inicio de la cadena polipeptídica. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos codificante de una unidad chaperón SlpA se encuentra situada cadena arriba de la secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido diana.

La dirección de "cadena abajo" se refiere a que el nucleótido se encuentra situado en dirección 3' del polinucleótido, es decir, hacia el final de la secuencia de nucleótidos. En términos de la secuencia de aminoácidos, la expresión "cadena arriba" se traduce en que un aminoácido se encuentra situado en dirección C-terminal, es decir, hacia el final de la cadena polipeptídica.

Se dice que un polinucleótido "codifica para" o "codifica" un polipéptido en el caso de que, en su estado nativo o al manipularlo mediante métodos conocidos de la técnica, el polinucleótido pueda transcribirse en un molde de nucleótidos y/o pueda traducirse para rendir el polipéptido o un fragmento del mismo.

Otro aspecto de la presente invención es un vector de expresión que comprende operablemente ligado a una molécula de ADN recombinante que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido diana y cadena arriba o cadena abajo de la misma, por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un chaperón SlpA.

Los constructos de ADN preparados para la introducción en un huésped típicamente comprenden un sistema de replicación reconocido por el huésped, incluyendo el fragmento de ADN deseado codificante del péptido de fusión diana deseado y preferentemente incluyen además secuencias reguladoras del inicio de la transcripción y la traducción operablemente ligadas al segmento codificante del polipéptido. Entre los sistemas de expresión (vectores de expresión) pueden incluirse, por ejemplo, un origen de replicación o secuencia de replicación autónoma (SRA) y secuencias de control de la expresión, un promotor, un intensificador y sitios necesarios de procesamiento de la información, tales como sitios de unión ribosómica, sitio de procesamiento del ARN, sitios de poliadenilación, secuencias terminadoras de la transcripción y secuencias estabilizadoras del ARNm.

El promotor apropiado y otras secuencias de vector necesarias se seleccionan de manera que resulten funcionales en el huésped. Se conocen de la técnica muchos vectores útiles para la expresión en bacterias, levadudras, células de mamífero, insecto, vegetales u otras y se encuentran disponibles comercialmente. Además, el constructo puede unirse a un gen amplificable de manera que puedan obtenerse múltiples copias del gen.

Los vectores de expresión y clonación probablemente contienen un marcador seleccionable, un gen codificante de una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de una célula huésped transformada con el vector, aunque dicho gen marcador puede ser portador por otra secuencia polinucleótida cointroducida en la célula huésped. Únicamente aquellas células huésped que expresan el gen marcador sobrevivirán y/o crecerán bajo condiciones selectivas. Entre los genes de selección típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los codificantes de proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras sustancias tóxicas, por ejemplo ampicilina, tetraciclina, etc., (b) deficiencias auxotróficas de complemento, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos. La elección del marcador seleccionable apropiado dependerá de la célula huésped y se conocen de la técnica marcadores apropiados para diferentes huéspedes.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped mediante cualquier método conocido de la técnica. Estos métodos varían dependiendo del tipo de sistema huésped respectivo, incluyendo, aunque sin limitación, la transfección utilizando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, otras sustancias y la infección por virus. Pueden prepararse grandes cantidades de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención mediante la expresión de los polinucleótidos de la presente invención en vectores u otros vehículos de expresión en células huésped compatibles. Los huéspedes procarióticos más comúnmente utilizados son cepas de *Escherichia coli*, aunque también pueden utilizarse otros procariotas, tales como *Bacillus subtilis*.

La expresión en *Escherichia coli* representa un modo preferente de llevar a cabo la presente invención. La expresión de proteínas de fusión que comprenden por lo menos una unidad SlpA y por lo menos una unidad de polipéptido X diana o la coexpresión de SlpA y X para rendir complejos SlpA-X solubles, estén SlpA y X unidos covalentemente o no, resulta factible en células huésped procarióticas además de en eucarióticas.

La construcción de un vector según la presente invención utiliza técnicas de ligación convencionales. Se cortan, ajustan y religan plásmidos o fragmentos de ADN aislados, en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos. Si se desea, el análisis para confirmar que las secuencias en los plásmidos construidos son las correctas se lleva a cabo de una manera conocida. Los métodos adecuados para construir vectores de expresión, preparar transcritos *in vitro*, introducir ADN en las células huésped y realizar análisis para evaluar la expresión y función son conocidos por el experto en la materia. La presencia, amplificación y/o expresión génicas pueden medirse en una muestra directamente, por ejemplo mediante transferencia southern convencional o transferencia northern para cuantificar la transcripción del ARNm, la transferencia por puntos (análisis de ADN o ARN) o la hibridación *in situ*,

utilizando una sonda apropiadamente marcada que puede basarse en una secuencia proporcionada en la presente memoria. El experto en la materia concebirá fácilmente cómo pueden modificarse estos métodos, si se desea.

Una realización adicional de la invención es una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende operablemente ligado a una molécula de ADN recombinante que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido diana y cadena arriba o cadena abajo de la misma, por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un chaperón SlpA.

Otra realización de la invención se refiere a un método de coexpresión de SlpA y un polipéptido diana en un huésped procariótico o eucariótico, en el que la SlpA sobreproducida interactúa con el polipéptido diana y forma un complejo no covalente soluble, que facilita la preparación de polipéptido diana plegado similar al nativo y activo. Lo anterior implica que las secuencias de ADN codificantes de SlpA y el polipéptido diana pueden estar localizadas en el mismo vector y controladas por promotores idénticos o diferentes. Alternativamente, las moléculas de ADN codificantes de SlpA y del polipéptido diana puede estar localizadas en diferentes vectores compatibles. Para la expresión simultánea de SlpA y el polipéptido diana las células huésped se transforman con ambos vectores. Preferentemente, los genes codificantes de la proteína diana y SlpA están controlados por promotores diferentes, los cuales responden a diferentes inductores. De esta manera, la inducción de SlpA y proteína diana pueden llevarse a cabo simultáneamente o consecutivamente de una manera controlada y definida. Por ejemplo, la expresión de SlpA puede inducirse en primer lugar para generar un nivel basal de chaperón funcional y posteriormente puede llevarse a cabo la inducción del gen diana. Aparte de este enfoque secuencial, resulta factible la inducción simultánea de ayudante de plegado y polipéptido diana y también puede rendir proteína diana soluble y funcional. Los genes codificantes de SlpA y la proteína diana pueden estar localizados en el mismo vector o en vectores diferentes.

La expresión "proteína de fusión" se refiere a que se combinan funcionalmente en una única cadena polipeptídica dos polipéptidos de otra manera separados. Los elementos individuales de la proteína de fusión, es decir, la parte chaperón SlpA y la parte polipéptido diana, también denominada polipéptido X diana, pueden ser directamente contiguos. Opcionalmente se encuentran separados por un conector peptídico de 1 a 100 residuos aminoácidos, preferentemente de 5 a 30 residuos aminoácidos, más preferentemente de aproximadamente 20 residuos aminoácidos. Tal como apreciará el experto en la materia, dicho polipéptido conector está diseñado como el más apropiado para la aplicación deseada, especialmente con respecto a la longitud, flexibilidad, carga e hidrofilicidad. La secuencia polipeptídica conectora puede contener además un sitio de corte proteolítico. Opcionalmente, la proteína de fusión puede contener además una secuencia peptídica de señal para dirigir la proteína al compartimiento deseado en el que debería tener lugar el plegado.

Según la invención, más de un polipéptido X diana, por ejemplo dos, tres o cuatro copias del polipéptido diana, puede ser parte de la proteína de fusión. A título de ejemplo, SlpA-X2 se refiere a que una unidad SlpA se encuentra fusionada con dos unidades polipeptídicas diana del tipo X. Las unidades individuales de polipéptido diana pueden encontrarse separadas o no por un segmento polipeptídico conector. La proteína de fusión contiene por lo menos una unidad de chaperón SlpA. Además, las combinaciones en tándem, triples o de orden superior pueden constituir la proteína de fusión, por ejemplo, SlpA-SlpA-X o SlpA-SlpA-SlpA-X. Además, las proteínas de fusión en las que el polipéptido diana se encuentra interpuesto entre por lo menos dos unidades de chaperón, forman parte de la invención, por ejemplo SlpA-X-SlpA o SlpA-SlpA-X-SlpA-SlpA.

SlpA es una peptidil-prolil cis/trans isomerasa putativa de la familia de FKBP. La secuencia de aminoácidos de SlpA de *E. coli* tal como se ha publicado en SwissProt nº de acceso P0AEM0 se muestra en SEC ID nº 1.

Según la invención, la expresión "secuencia de nucleótidos codificante de un chaperón SlpA" se refiere a una secuencia de nucleótidos codificante de un fragmento polipeptídico que comprende el segmento de unión a polipéptido de SlpA. La expresión "segmento de unión a polipéptido" de un chaperón se refiere a la parte competente para la unión del chaperón, es decir, la parte que se une y sujeta la cadena polipeptídica cliente o sustrato y, de esta manera, la secuestra, reduciendo la concentración de los intermediarios de plegado con tendencia a la agregación y facilitando el posterior plegado. El "segmento de unión a polipéptido" de SlpA también puede denominarse dominio IF ("insert in flap domain", dominio de inserción en solapa). Definido como una unidad de plegado autónomo, un dominio de proteína es capaz de adoptar un plegado estable similar al nativo en solución acuosa bajo las condiciones de replegado apropiadas. Las expresiones "segmento de unión a polipéptido", "bucle IF", "dominio IF" o "dominio de chaperón" pueden utilizarse como sinónimos.

"SlpA" o "chaperón SlpA" o "unidad SlpA" según la invención comprenden el segmento de unión a polipéptido o dominio IF de SlpA. Preferentemente, la molécula entera de SlpA de *E. coli* se utiliza como pareja de fusión. Alternativamente, el dominio IF de SlpA puede utilizarse como pareja de fusión. Comprende por lo menos un fragmento que se inicia N-terminalmente con cualquier aminoácido sistuado entre el aminoácido 59 y el 78 de la SEC ID nº 2 y finaliza C-terminalmente con cualquier aminoácido situado entre el aminoácido 125 y el 139 de la SEC ID nº 2. Más preferentemente es una secuencia codificante de un polipéptido que se inicia N-terminalmente con el aminoácido nº 72 (valina 72) y finaliza C-terminalmente con el aminoácido nº 132 (treonina 132) de la SEC ID nº 2. Según la invención, SlpA se refiere a la forma no humanizada madura de dicho chaperón. Lo anterior implica que el

chaperón SlpA no contiene ni N-terminalmente ni C-terminalmente secuencias flanqueantes de FKBP12 o cualquier otro FKBP humano.

Según la invención, pueden utilizarse homólogos de chaperón SlpA de otros organismos como ayudantes de plegado que combinan una prolil isomerasa con una actividad de chaperón. Dichos homólogos de SlpA pueden originarse a partir de los organismos siguientes (los números de ID de la base de datos SwissProt se indican entre paréntesis): *Shigella flexneri* (Prot.ID. P0AEM3), *Shigella sonnei* (Prot.ID Q3Z5Y2), *Shigella dysenteriae* (Prot. ID Q32K69), *Citrobacter Koseri* (Prot.ID A8ALT4), *Salmonella typhi* (Prot.IDQ8XG79), *Salmonella typhimurium* (Prot.ID Q7CR92), *Salmonella paratyphi* A and B (Prot.ID Q5PKI5 and A9MYG7), *Salmonella choleraesuis* (Prot.ID Q57TL3), *Klebsiella pneumoniae* (Q9RF46), *Salmonella arizonae* (Prot.ID A9MR44), *Enterobacter sp.* (Prot.ID A4W6E3), *Enterobacter sakazakii* (A7MIM1), *Serratia proteamaculans* (Prot.ID A8G9L6), *Yersinia pestis* (Prot.ID Q8CZP4 or Q0WJI9), *Yersinia pseudotuberculosis* (Prot.ID A7FMD5), *Yersinia enterolitica* (A1JJE3), *Erwinia carotovora* (Prot.ID Q6D0C5), *Photorabdus luminescens* (Prot.ID Q7N8X0), *Sodalis glossinidius* (Prot.ID Q2NVY4), *Idiomarina baltica* (Prot.ID A3WMS1), *Vibrio harveyi* (Prot.ID A6ATG3 or A7MTD8), *Vibrio vulnificus* (Prot.ID Q7MNM6 or Q8DES9), *Vibrio campbellii* (Prot.ID A8T7R0), *Vibrio shilonii* (Prot.ID A6D8Q3), *Vibrio splendidus* (Prot.ID A3UXQ8), *Idiomarina loihiensis* (Prot.ID Q5QZR6), *Vibrio alginolyticus* (Prot.ID Q1V5T9), *Aeromonas salmonicida* (Prot.ID A4SIX7), *Photobacterium sp.* (Q2C7V1), *Vibrio parahaemolyticus* (Prot.ID Q87S88 or A6B565), *Pseudoalteromonas atlantica* (Prot.ID Q15R06), *Vibrio cholerae* (Prot.ID A5F8X4, or Q9KU45, or A6Y5H7, or A6XZU4, or A6ADB4, or A6A5W5, or A3H4C9, or A3GPA9, or A3EG01, or A2PSS5, or A2P8T9, or A1F6Q8), *Aeromonas hydrophila* (Prot.ID A0KG41), *Vibrio angustum* (Prot.ID Q1ZMQ4), *Moritella sp.* (Prot.ID A6FG75), *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Prot.ID Q3IEA0), *Alteromonadales bacterium* (Prot.ID A0Y1B2), *Psychromonas ingrahamii* (Prot.ID A1SZP1), *Vibrio fischeri* (Prot.ID Q5E7N2 o A9IPH0), *Photobacterium profundum* (Prot.ID Q1Z378 o Q6LUK9), *Pseudoalteromonas tunicata* (Prot.ID A4C627), *Psychromonas sp.* (Prot.ID Q1ZHS3), *Reineka sp.* (Prot.ID A4BJL0), *Vibrio psychroerythus* (Prot.ID Q486T8), *Shewanella amazonensis* (Prot.ID A1S427), *Shewanella sp.* (Prot.ID Q0HFZ1, or Q0HS84, or A0KZY9), *Shewanella pealeana* (Prot.ID A8H1H5), *Shewanella frigidimarina* (Prot.ID Q07Z37), *Shewanella denitrificans* (Prot.ID Q12KM6), *Shewanella loihica* (Prot.ID A3QBX4) y *Shewanella putrefaciens* (Prot.ID A4Y4A6).

Según la invención, la secuencia del chaperón SlpA puede modificarse con sustituciones de aminoácidos, preferentemente sustituciones, deleciones e inserciones homólogas con la condición de que la estructura, función y estabilidad globales del chaperón SlpA se mantengan. El mantenimiento de la función de dicha variante de SlpA puede someterse a ensayo fácilmente determinando la temperatura de fusión de una proteína de fusión que comprende un polipéptido diana y la secuencia del chaperón SlpA bajo investigación. La temperatura de fusión se define como la temperatura a la que el 50% de las moléculas se encuentran plegadas y el 50% se encuentran no plegadas, es decir, la temperatura de fusión determina el punto medio de la transición de desplegado inducida térmicamente en un sistema tamponador dado a una concentración de proteína dada. Dependiendo del contenido en residuos aromáticos, puede realizarse un seguimiento de la fusión de las proteínas con sondas espectroscópicas simples, tales como la absorbancia de UV, la fluorescencia o el dicroísmo circular. El dicroísmo circular, en particular, resulta muy adecuado para monitorizar los cambios conformacionales en la estructura secundaria (CD de amidas o CD de UV lejano) o en la estructura terciaria (CD aromático o CD de UV próximo) de las proteínas.

El desplegado inducido térmicamente de SlpA tal como se evalúa mediante CD de UV próximo revela que el proceso de desplegado es totalmente reversible, es decir, SlpA readopta espontáneamente su conformación nativa tras enfriar la muestra de 95ºC a la temperatura ambiente, es decir, 15ºC a 25ºC. Esta reversibilidad del plegado y desplegado es un prerrequisito crítico de un ayudante de plegado ideal en las aplicaciones biotecnológicas: con frecuencia, las proteínas de fusión recombinantes se acumulan en forma de cuerpos de inclusión en el citosol de *E. coli* en el caso de que se produzcan en fuerte exceso. En este caso, debe prepararse un protocolo de renaturalización robusto y eficiente, partiendo de células bacterianas o cuerpos de inclusión lisados en cloruro de guanidinio 7,0 M u otros agentes caotrópicos tales como la urea. Resulta autoevidente que el replegado de cualquier pareja de fusión de chaperón debe ser suficientemente robusto, eficiente y reversible con el fin de ayudar en el replegado *in vitro* de la proteína cliente deseada. Muchas parejas de fusión conocidas de la técnica anterior, tales como, por ejemplo, NusA, PUM (proteína de unión a maltosa) y GST (glutatión S-transferasa) muestran un plegado de novo muy robusto tras la traducción en la célula huésped, pero no pueden replegarse fácilmente tras el desplegado inducido térmica o químicamente. Por lo tanto, estas parejas de fusión se utilizan con el fin de permitir la expresión soluble de la proteína diana en el sistema huésped. En el caso de que no consigan conferir solubilidad a sus proteínas cliente durante el plegado *de novo* tras la traducción en la célula huésped, resulta difícil la recuperación de las proteínas de fusión agregadas mediante intentos de renaturalización *in vitro*. Según la presente invención, una pareja de fusión totalmente reversible, tal como SlpA, presenta ventajas evidentes en el aspecto de que puede conducir también a una producción de proteína soluble tras el plegado *de novo* en la célula huésped. Además, SlpA, en virtud de su reversibilidad de plegado, puede utilizarse también para ayudar en el replegado *in vitro* de un polipéptido de fusión que ha acumulado en cuerpos de inclusión insolubles tras la sobreproducción masiva en la célula huésped. La reversibilidad completa del desplegado en combinación con una elevada estabilidad intrínseca y características de chaperón sustanciales son prerrequisitos importantes de una pareja de fusión según la presente invención. Estos criterios son cumplidos perfectamente por SlpA.

Según la invención, una o más, preferentemente dos, secuencias de nucleótidos codificantes de un chaperón SlpA se encuentran situadas cadena arriba de la secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido diana, resultando

en un chaperón SlpA en tándem que comprende dos unidades de SlpA contiguas. La secuencia o secuencias de nucleótidos codificantes de un chaperón SlpA pueden encontrarse separadas por una secuencia de nucleótidos codificante (en el mismo marco) de un conector peptídico de 1 a 100 aminoácidos. Pueden utilizarse diferentes secuencias de nucleótidos para codificar las dos unidades de chaperón SlpA. Además, deberían utilizarse diferentes secuencias de nucleótidos para codificar todos los demás elementos altamente repetitivos, tales como segmentos conectores o espaciadores dentro del polipéptido de fusión. Las secuencias de nucleótidos deben ser degeneradas con el fin de evitar la pérdida de una secuencia codificante de SlpA debido a sucesos de recombinación involuntaria en el huésped *E. coli*. Mediante la selección cuidadosa de diferentes codones para secuencias de aminoácidos idénticas o repetitivas, puede garantizarse la estabilidad del casete de expresión.

Un "polipéptido diana" según la invención puede ser cualquier polipéptido (es decir, cualquier secuencia de aminoácidos) de solubilidad o estabilidad limitada, que tienda a agregarse bajo condiciones desfavorables y que requiera el soporte o la asistencia de un ayudante de plegado, con la condición de que las proteínas de unión FK506 (FKBP), en particular las proteínas de unión FK506 humanas, sean excluidas como polipéptidos diana. Lo anterior significa que las proteínas de fusión FK506 tales como, por ejemplo, la FKBP12 humana, resulten excluidos como polipéptidos diana. En una realización preferente, los polipéptidos que muestran una tendencia a la agregación y/o sean susceptibles al estrés térmico, pueden utilizarse como polipéptido diana. Además, los polipéptidos con actividad enzimática son polipéptidos diana preferentes según la invención. En particular, los enzimas que aceptan y actúan sobre sustratos hidrofóbicos (y por lo tanto incluyen patrones de superficie hidrofóbica ellos mismos) son polipéptidos diana preferentes según la invención. En una realización preferente adicional, se utilizan como polipéptidos diana proteínas bacterianas o víricas o proteínas priones o proteínas asociadas a la artritis reumatoide.

Puede utilizarse como polipéptido diana cualquier producto génico estructural, asociado a membrana, unido a membrana o secretado de un patógeno de mamífero. Entre los patógenos de mamífero se incluyen virus, bacterias, parásitos unicelulares o multicelulares que pueden infectar o habitar en un huésped mamífero. Por ejemplo, los polipéptidos originados en virus tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), vaccinia, poliovirus, adenovirus, influenza, hepatitis A, hepatitis B, virus Dengue, de la encefalitis japonesa B, varicela zóster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, rotavirus, así como virus que provocan el sarampión, la fiebre amarilla, la parotiditis, la rabia, herpes, influenza, parainfluenza y similares como polipéptido diana en la proteína de fusión según la invención. Pueden utilizarse como polipéptido diana proteínas bacterianas de, por ejemplo, *Vibrio cholerae, Salmonella typhi, Treponema pallidum, Helicobacter pylori, Bordetella pertussis, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae, Mycobacterium leprae, R. rickettsii, Shigella, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Coccidioides immitis, Borrelia burgdorferi* y similares.

Entre los ejemplos adicionales de polipéptidos diana producidos preferentemente mediante los presentes métodos se incluyen productos génicos de mamífero, tales como enzimas, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, vacunas, anticuerpos y similares. Más particularmente, entre los productos génicos sobreexpresados preferentes de la presente invención se incluyen productos génicos tales como eritropoyetina, insulina, somatotropina, factor liberador de la hormona del crecimiento, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor a de crecimiento transformante, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento nervioso, factor I de crecimiento similar a la insulina, factor II de crecimiento similar a la insulina, factor de coagulación VIII, superóxido dismutasa, interferón, γ-interferón, interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-2, interleuquina-3, interleuquina-4, interleuquina-5, interleuquina-6, factor estimulante de colonia de granulocitos, factor estimulante de colonias multilinaje, factor estimulante de granulocitos-macrófagos, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de crecimiento de células T, linfotoxina y similares. Los productos génicos sobreexpresados preferentes son productos génicos humanos.

Con fines diagnósticos, en el caso de que, por ejemplo, el analito que debe determinarse sea un anticuerpo, los polipéptidos diana contienen por lo menos un epítopo que resulta reconocido por los anticuerpos que deben determinarse. Dichos epítopos también se denominan diagnósticamente epítopos relevantes. Un polipéptido diana según la invención puede comprender además secuencias como, por ejemplo, epítopos diagnósticamente relevantes de varias proteínas diferentes construidas para expresarse en forma de un polipéptido recombinante individual. Preferentemente, el polipéptido diana presenta una longitud de entre 10 y 500 aminoácidos.

Más preferentemente, el polipéptido diana es un elemento de un grupo que consiste de proteínas retrovíricas, tales como gp41 y p17 del VIH-1, gp36 y p16 del VIH-2, gp21 del HTLV-I/II, que consiste de proteínas de cubierta vírica tales como E1 y E2 del virus de la rubeola o que consiste de proteínas amiloidogénicas tales como β-AP42 (péptido del Alzheimer) o proteína priónica.

También resultan preferentes como polipéptidos diana, la glucoproteína G1 del virus del herpes simplex 1 y la glucoproteína G2 del virus del herpes simplex 2. Más exactamente, los fragmentos de glucoproteína respectivos que no presentan sus secuencias de señal y sus regiones transmembrana (gG1 26-189, gG2 343-594) son polipéptidos diana adecuados.

Resultan preferentes adicionalmente como polipéptidos diana las proteínas y fragmentos de proteína siguientes del

citomegalovirus humano: pp28 (15-179), pp150 (821-1048), pp150 (547-725), pp150 (495-854), p38 (105-308), p38 (105-373), p38 (209-308), p52 (254-293), p52 (295-330), p52 (298-433), gB (67-84), pp65 (372-549) y pp65 (372-458).

También resultan preferentes las proteínas y fragmentos de proteína siguientes de *Treponema pallidum*: TpN17 (23-156), TpN47 (21-434), TpN15 (23-142), TmpA (23-345), TpO453 (27-287). Las secuencias de señal de la totalidad de dichos antígenos de *Treponema* han sido omitidos para garantizar la localización citosólica tras la expresión en el huésped *E. coli*.

Resultan preferentes adicionalmente como polipéptidos diana las proteínas y fragmentos de proteína siguientes de *Borrelia*: el fragmento de flagelina interno p41i (137-262), VlsE (IR6/C6), DbpA (26-175), OspB (17-296) y OspC (19-214).

Son polipéptidos diana preferentes adicionales, las proteínas del virus de Epstein-Barr (VEB), tales como el antígeno nuclear 1 del VEB (EBNA-1), tal como se muestra en la SEC ID nº 13, polipéptidos y fragmentos de p18 tal como se muestra en la SEC ID nº 14 y nº 15, respectivamente, y polipéptidos derivados de p23, tal como se muestra en la SEC ID nº 16.

Cualquiera de dichos polipéptidos diana fusionado con un chaperón SlpA puede utilizarse en un inmunoensayo como pareja de unión para la detección de un analito como, por ejemplo, anticuerpos contra el polipéptido diana o pueden utilizarse como estándar o material de calibración para inmunoensayos tal como se indica en mayor detalle posteriormente.

Una realización adicional de la invención es un método para producir una proteína de fusión, comprendiendo dicho método las etapas de: a) cultivar células huésped que comprenden por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido diana y cadena arriba de la misma, por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un chaperón SlpA, b) la expresión de dicha proteína de fusión, c) la purificación de dicha proteína de fusión, y d) el replegado en una conformación soluble y similar a la nativa o inmunorreactiva (es decir, antigénica). Una proteína de fusión producida mediante dicho método también es un aspecto de la invención.

Las proteínas de fusión según la invención muestran una solubilidad elevada. Al sobreexpresarse a una velocidad baja en el citosol, se acumulan principalmente en la fracción soluble. Dependiendo de las condiciones de crecimiento e inducción celulares, especialmente en el caso de que se sobreexpresen fuertemente, los productos génicos SlpA-X también pueden acumularse en cuerpos de inclusión. Habitualmente, el experto en la materia presente el objetivo de sobreproducir los polipéptidos diana solubles en el citosol de *E. coli*. A continuación, se rompen las células mediante sonicación o un tratamiento combinado de lisozima/EDTA y las putativas proteínas diana plegadas similares a las nativas se aíslan a partir de la fracción soluble. Lo anterior resulta factible para las proteínas de fusión SlpA-X y conduce a un material soluble en el caso de que el polipéptido diana X presente una solubilidad intrínseca suficientemente elevada. En el caso de que el polipéptido X diana sea muy hidrofóbico y tienda fuertemente a la agregación, puede aplicarse una estrategia alternativa que aprovecha las propiedades de replegado eficientes y robustas de SlpA en un enfoque de renaturalización asistido por matriz. Se lisan las células bajo condiciones de tampón apropiadas como, por ejemplo, en sustancias caotrópicas, las cuales son fuertemente desnaturalizantes y solubilizan componentes celulares incluso hidrofóbicos y también los cuerpos de incluso, aunque a expensas de la integridad estructural. En el caso de que las proteínas de fusión se etiqueten N- o C-terminalmente con una fracción hexahistidina, pueden unirse específicamente en un estado no plegado a una columna que contiene metal (soportes de Ni-NTA o Zn^{2+} o Cu^{2+}). Inmovilizadas en la fase sólida, las moléculas se repliegan fácil y eficientemente bajo condiciones de tampón apropiadas. Dicha denominada renaturalización asistida por matriz, que se ha demostrado que incrementa el rendimiento de replegado de muchas proteínas difíciles, resulta fuertemente soportada por SlpA unida covalentemente, que, en virtud de sus propiedades de chaperón, posiblemente reorganiza y enmascara reversiblemente las áreas hidrofóbicas en los intermediarios de plegado. Los protocolos apropiados de purificación y replegado tal como se muestran en mayor detalle en la sección de Ejemplos son bien conocidos por el experto en la materia.

Un aspecto adicional de la invención se ref iere a cualquier complejo que comprende SlpA y la secuencia polipeptídica diana, que incluye la adición de SlpA a cualquier formulación de proteínas. Un aspecto adicional de la invención se refiere a una proteína de fusión producida recombinantemente que comprende por lo menos una secuencia polipeptídica correspondiente a SlpA y por lo menos una secuencia polipeptídica correspondiente a un polipéptido diana. Un aspecto adicional de la invención se refiere a un SlpA producido sintéticamente solo o en combinación con un polipéptido diana de origen recombinante o sintético.

Según la invención, un chaperón SlpA es capaz de mejorar la estabilidad térmica de los polipéptidos diana difíciles al utilizarlo como pareja de fusión. SlpA confiere estabilidad térmica a un polipéptido diana fusionado, provocando de esta manera que el polipéptido diana sea menos susceptible a la agregación inducida por calor tal como se muestra en la sección de Ejemplos. En el caso de que las proteínas diana con fuerte tendencia a la agregación fusionadas con SlyD de *E. coli* se sometan a estrés térmico, las proteínas de fusión resultante muestran un inicio de agregación inducida térmicamente a aproximadamente 42ºC, lo que concuerda bastante bien con la estabilidad inherente de

SlyD. En el caso de que las mismas proteínas diana se fusionen con SlpA, preferentemente con SlpA de *E. coli*, se mantienen estables y solubles hasta aproximadamente 56ºC. Por ejemplo, una proteína de fusión que contiene SlyD y el fragmento 536-681 de la proteína gp41 del VIH (SEC ID nº 5) empieza a agregarse a una temperatura de 42ºC, mientras que la misma proteína diana fusionada con SlpA de *E. coli* (SEC ID nº 3) según la invención es térmicamente estable a temperaturas más allá de 50ºC. Puede demostrarse que SlpA como parte de una proteína de fusión protege a las proteínas difíciles o con tendencia a la agregación frente a la agregación tras la desnaturalización inducida por calor.

También puede demostrarse que la fusión de SlpA ejerce un efecto beneficioso incluso sobre proteínas o fragmentos de proteína que presentan una menor tendencia a la agregación. En el caso de que el fragmento gG1 (26-189) de la glucoproteína G1 del VHS-1 se fusione con SlyD, la proteína de fusión resultante puede desplegarse térmicamente de manera mayoritariamente reversible, con una temperatura de fusión aproximada de 53ºC (figura 7). Sin embargo, en el caso de que el mismo fragmento se fusione con SlpA, la proteína de fusión resultante muestra un punto medio de desplegado térmicamente inducida a aproximadamente 63ºC (figura 8). Evidentemente la estabilidad del polipéptido de fusión de gG1 se desplaza en 10ºC tras la sustitución de SlpA por SlyD como pareja de fusión. Este resultado demuestra claramente las superiores características de estabilidad de un polipéptido de fusión SlpA-X en comparación con su contrapartida SlyD-X.

Con el fin de elucidar si estas características de estabilidad superior de los polipéptidos de fusión de SlpA también se reflejan en un inmunoensayo, se evaluaron muestras retadas térmicamente de SlyD-gG1 y SlpA-gG1 con sueros humanos positivos y negativos para anti-VHS (Ejemplo 4) para su inmunorreactividad recuperada tras el estrés térmico. En comparación con muestras no estresadas, se observó un claro resultado (ver el Ejemplo 4 y la figura 9): la señal generada por SlyD-gG1 y SlpA-gG1 tratadas por calor con sueros positivos para anti-VHS se redujo en todos los casos, pero la pérdida de señal era mucho más pronunciada con la variante de fusión de SlyD. A su vez, la señal de fondo generada por SlyD-gG1 y SlpA-gG1 tratados por calor con sueros negativos para anti-VHS se incrementó en todos los casos (indicativo de procesos de agregación del antígeno conjugado con rutenio), pero el incremento de la altura de la señal nuevamente era mucho más pronunciado con la variante de fusión con SlyD. Con respecto al resultado de señal para sueros tanto positivos como negativos (es decir, con respecto a la dinámica de la señal), SlpA por lo tanto es claramente superior a SlyD como pareja de fusión para gG1 (26-189). Evidentemente la utilización de SlpA en lugar de SlyD como pareja de fusión garantiza tanto un nivel de señal más bajo con sueros negativos como una recuperación de señal más alta con sueros positivos. Brevemente, la utilización de SlpA como pareja de fusión garantiza una dinámica de la señal excelente incluso tras un tratamiento fuerte de un kit de inmunoensayo que contenga polipéptidos antigénicos para la detección de analitos inmunoglobulina. Es perfectamente concebible que SlpA o módulos chaperón relacionados que se unan covalentemente a sus moléculas diana mediante enlaces cruzados suficientemente largos y flexibles (mediante métodos químicos estándares) ejerzan un efecto solubilizador similar. En dichos casos, en el caso de que no resulte factible un polipéptido de fusión, el chaperón y la molécula diana se produciría y replegaría separadamente antes de unirse covalentemente.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a la utilización de una proteína de fusión producida recombinante o sintéticamente que comprende un chaperón SlpA y un polipéptido diana como pareja de unión en un inmunoensayo. Los inmunoensayos y diversos formatos de ensayo homogéneos y heterogéneos son bien conocidos por el experto en la materia. Pueden llevarse a cabo en todos los líquidos biológicos conocidos por el experto en la materia. Son muestras preferentes líquidos corporales como sangre completa, sueros san guíneos, plasma sanguíneo, orina o saliva.

Los polipéptidos de fusión que comprenden SlpA y por lo menos un polipéptido diana según la invención también pueden utilizarse como estándar o material de calibración. SlpA también es una buena pareja de fusión para proteínas difíciles que resultan necesarias como calibradores en inmunoensayos. Por ejemplo, los presentes inentores clonaron, expresaron y purificaron una variante troponina I (que comprende los residuos 1 a 209) en fusión con SlpA. El polipéptido de fusión SlpA-troponina I resultante resultó ser soluble e inmunorreactivos y era adecuado como material calibrador estándar para un inmunoensayo de troponina I. Debido a la pareja de fusión SlpA, la estabilidad de la fracción troponina I se incrementó sustancialmente en comparación con troponina I aislada, que sólo es marginalmente estable y se agrega espontáneamente incluso bajo condiciones de tampón favorables. La utilización de SlpA acomplejado con proteínas difíciles para generar materiales calibradores o estándares solubles y estables es una realización adicional de la invención. Un aspecto todavía adicional es la utilización de SlpA como aditivo para mejorar la solubilidad y evitar la agregación de una proteína diana.

Una realización adicional de la invención es un método para la detección de anticuerpos específicos para un analito en una muestra ailsada, comprendiendo dicho método:

a) formar una mezcla de inmunorreacción mediante la mezcla de una muestra de líquido corporal con una proteína de fusión que comprende por lo menos una secuencia polipeptídica correspondiente a un chaperón SlpA y por lo menos una secuencia polipeptídica correspondiente a un polipéptido diana,

b) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos contra dicho analito presente en la muestra de líquido corporal inmunorreaccionen con dicha proteína de fusión para formar un producto de inmunorreacción, y

c) detectar la presencia de dicho producto de inmunorreacción.

En una realización preferente, la detección de anticuerpos específicos puede llevarse a cabo mediante el ensayo denominado de tipo sándwich de doble antígeno (DAGS, también denominado ensayo de puente), un formato heterogéneo en el que el analito anticuerpo específico que debe deteerminarse forma un puente entre dos antígenos idénticos o similares. Este formato puede adaptarse fácilmente a analizadores automáticos de alto rendimiento. Más específicamente, los anticuerpos que deben determinarse forman un inmunocomplejo o producto de inmunorreacción con un primer antígeno que media en la inmovilización en una fase sólida y con un segundo antígeno que porta un marcaje (es decir, una fracción de señalización como un marcaje cromogénico, fluorescente, quimioluminiscente, electroquimioluminiscente u otros marcajes que son conocidos por el experto en la materia), permitiendo de esta manera la detección cuantitativa o cualitativa de los anticuerpos unidos específicamente tras la separación del líquido y la fase sólida. Por lo tanto, únicamente en el caso de que los anticuerpos bajo investigación se encuentre presentes en la muestra, se forma un puente y puede detectarse una señal. En dicho formato de ensayo, las proteínas de fusión según la invención pueden utilizarse como parejas de fusión en las que el antígeno unido a la fase sólida o el antígeno marcado o ambos son proteínas de fusión que comprende un chaperón SlpA de *E. coli* y un polipéptido diana. El polipéptido diana constituye la parte antigénica de la proteína de fusión.

Una realización preferente de la invención es un ensayo denominado de tipo sándwich de doble antígeno asimétrico para la detección de un anticuerpo específico en el que se utiliza una primera proteína de fusión y una segunda proteína de fusión, en el que cada una comprende un chaperón y un polipéptido diana. Dicho formato se denomina asimétrico debido a que las unidades de chaperón de ambas proteínas de fusión son diferentes. Por ejemplo, la primera proteína de fusión puede comprender por lo menos una unidad de chaperón SlpA y por lo menos una unidad de polipéptido diana y puede portar una fracción que media en la unión específica a una fase sólida como, por ejemplo, la biotina, que se une a una fase sólida recubierta con estreptavidina. La segunda proteína de fusión puede comprender por lo menos una unidad de chaperón diferente de SlpA y por lo menos un polipéptido diana que es idéntico o similar al polipéptido diana de la primera proteína de fusión. Además, la última proteína de fusión puede portar una fracción de señalización o un grupo informador para la lectura de señal.

Preferentemente, la unidad de chaperón de la segunda proteína de fusión también es un chaperón termoestable con suficiente flexibilidad intrínseca (es decir, actividad de unión altamente dinámica) a temperatura ambiente. Son candidatos adecuados para la unidad de chaperón de la segunda proteína de fusión, por ejemplo, FkpA (temperatura de fusión de aproximadamente 50ºC) y una variante truncada C-terminalmente (sin cisteínas) del ortólogo de SlyD de *Pasteurella multocida* (temperatura de fusión de aproximadamente 49ºC). Las secuencias de aminoácidos de ambos chaperones (secuencias completas y secuencias parciales utilizadas preferentemente como unidad de chaperón en una proteína de fusión) se muestran en las SEC ID nº 9 a nº 12. La unidad de chaperón de la primera y segunda proteínas de fusión pueden intercambiarse, es decir, SlpA puede ser parte de la segunda proteína de fusión y en este caso el otro chaperón termoestable, tal como, por ejemplo FkpA o el ortólogo de SlyD de *Pasteurella multocida*, puede ser parte de la primera proteína de fusión. La primera y segunda proteínas de fusión se añaden, simultánea o consecutivamente, a una muestra bajo investigación para un anticuerpo analito específico. El anticuerpo en caso de hallarse presente en la muestra, se une a las unidades de polipéptido diana de la primera y la segunda proteínas de fusión, puenteando de esta manera las partes del polipéptido diana de dicha primera y dicha segunda proteínas de fusión, resultando en un producto de inmunorreacción o inmunocomplejo. Antes, después o concomitantemente con la formación de un inmunocomplejo, se añade una fase sólida, tal como, por ejemplo, microperlas o una placa ELISA, de manera que la primera proteína de fusión se une a la fase sólida. Como consecuencia, el producto de inmunorreacción completo (es decir, el inmunocomplejo) que comprende dicha primera proteína de fusión, el anticuerpo que debe detectarse y dicha segunda proteína de fusión se unen a la fase sólida. Tras la separación de la fase sólida de la fase líquida, puede detectarse la presencia del producto de inmunorreacción. A modo de alternativa, las unidades de chaperón presentes en la primera proteína de fusión pueden utilizarse como unidades de chaperón para la segunda proteína de fusión y viceversa. Sin embargo, las unidades de chaperón preferentemente debería ser diferentes en ambas proteínas de fusión debido al posible enlace cruzado no específico de analito (impredecible) de las proteínas de fusión debido a la presencia de anticuerpos contra dichos chaperones en la muestra. A modo de alternativa, también resultaría factible un inmunoensayo DAGS altamente específico con parejas de fusión de chaperón idénticas en cada lado del ensayo. En este escenario, el desarrollador del ensayo debe considerar como altamente probable la presencia de anticuerpos contra la pareja de fusión utilizada en una fracción sustancial de sueros humanos. Estos anticuerpos puentearían el polipéptido de señalización con la fase sólida, incrementar la señal y, de esta manera, evocar resultados falsamente positivos. Con el fin de evitar dichas interferencias, la pareja de fusión (es decir, la unidad de chaperón) se añadiría a la muestra en una forma altamente polarizada y no marcada como sustancia anti-interferencia. La sustancia anti-interferencia está diseñada para capturar eficientemente inmunoglobulinas dirigidas contra la pareja de fusión, los segmentos conectores, el espaciador y las secuencias de etiqueta y todas las demás fraccions que no forman parte del antígeno genuino. En virtud de su elevada densidad de epítopos, una sustancia anti-interferencia químicamente polimerizada (es decir, entrecruzada) es capaz de competir eficientemente con el polipéptido de fusión marcado para la unión de los anticuerpos anti-chaperón. De esta manera, las interferencias debido a las inmunoglobulinas con especificidades no deseadas pueden descartarse de una manera conveniente y fiable. Como muestras pueden utilizarse todos líquido biológico, tal como los líquidos corporales. Preferentemente se utiliza sangre, suero, plasma, orina o saliva.

El grupo de marcaje o de señalización puede seleccionarse de entre cualesquiera grupos indicadores detectables conocidos, tales como pigmentos, grupos de marcaje luminiscente, tales como grupos quimioluminiscentes, por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos, o pigmentos fluorescentes, por ejemplo fluoresceína, coumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos. Otros ejemplos de grupos de marcaje son los complejos metálicos luminiscentes, tales como los complejos de rutenio o de europio; enzimas, por ejemplo los utilizados para ELISA o los isótopos radioactivos.

La unión del inmunocomplejo o producto de inmunorreacción a la fase sólida puede llevarse a cabo utilizando una pareja de un par de unión bioafín como, por ejemplo, biotina y estreptavidina. Preferentemente, se acopla biotina con la proteína de fusión según la invención. Este conjugado de biotina-proteína de fusión se une con elevada afinidad a una fase sólida recubierta con estreptavidina.

Son ejemplos de analitos todos los patógenos y anticuerpos contra dichos patógenos mencionados bajo la sección de "polipéptido diana". Por ejemplo, según la invención preferentemente pueden detectarse específicamente anticuerpos contra el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), HTLV-1/HTLV-II (virus linfotrópico de las células T humanas I y II), VHC (virus de la hepatitis C), VHA (virus de la hepatitis A), VCMH (virus citomegálico humano), VHS-1/-2 (virus del herpes simple 1 y 2), VEB (virus de Epstein-Barr), virus de la varicela-zóster, virus del herpes humano 6, virus del herpes humano 7, virus del herpes humano 8, virus de la rubeola, *Treponema pallidum, Helicobacter pylori, Borrelia (burgdorferi, afzelii, garinii), Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*. Todavía otra realización de la invención es un kit de reactivos para la detección de anticuerpos contra un analito, que contiene una proteína de fusión que comprende por lo menos una secuencia polipeptídica correspondiente a SlpA y por lo menos una secuencia polipeptídica correspondiente a un péptido diana. El experto en la materia conocerá partes adicionales de dicho kit de reacciones y entre ellas se incluyen tampones, conservantes, sustancias de marcaje e instrucciones de utilización.

Entre las realizaciones adicionales de la invención se incluyen la utilización de una proteína de fusión producida recombinante o sintéticamente según la invención como medio para la reducción de interferencias en un inmunoensayo y la utilización de la misma para la inmunización de animales de laboratorio y la producción de una vacuna.

Otra realización de la invención se refiere a una composición que comprende una proteína de fusión producida recombinante o sintéticamente que comprende por lo menos una secuencia polipeptídica correspondiente a SlpA y por lo menos una secuencia polipeptídica correspondiente a un péptido diana y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Según la invención, puede utilizarse SlpA como ayudante de plegado para polipéptidos diana mediante la adición de SlpA en forma purificada a un polipéptido diana, que incluye la adición de SlpA a cualquier formulación de proteínas como agente estabilizador o solubilizador. Por ejemplo, puede añadirse SlpA y ayudantes de plegado relacionados de la familia de FKBP de peptidil-prolil cis/trans isomerasas durante o después del procedimiento de producción biotecnológica de polipéptidos diana, confiriendo de esta manera solubilidad o estabilidad térmica al polipéptido diana. Entre dichas aplicaciones biotecnológicas se incluyen, por ejemplo, la producción industrial a gran escala de enzimas, hormonas peptídicas, tales como, por ejemplo, la insulina o, más generalmente, proteínas de interés comercial.

En una realización adicional de la invención, puede utilizarse SlpA como aditivo en inmunoensayos para reducir o suprimir las reacciones cruzadas inmunológicas o interferencias que producen resultados erróneamente positivos, en particular en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich de doble antígeno.

Más específicamente, en un inmunoensayo pueden utilizarse proteínas de fusión SlpA-X o SlpA-SlpA-X como antígenos para la detección de un analito inmunoglobulina en el que X es el polipéptido diana al que se unen los anticuerpos específicos de analito. Para reducir interferencias, puede añadirse SlpA o SlpA-SlpA como sustancia anti-interferencia para evitar reacciones cruzadas inmunológicas mediante la unidad de chaperón. Preferentemente, se añaden SlpA o SlpA-SlpA en una forma químicamente polimerizada con el fin de incrementar la densidad de epítopos y para fomentar la unión de las moléculas de IgG e IgM dirigidas a SlpA, los segmentos conectores o la etiqueta hexahistidina.

SlpA confiere solubilidad y estabilidad a las moléculas diana pero podría, al igual que otra fracción o grupo diferente de la molécula diana misma, producir reacciones cruzadas inmunológicas que comprometan la especificidad del inmunoensayo respectivo. Con el fin de superar dicho problema de especificidad, se implementa una variante no marcada de SlpA o de SlpA-SlpA en los reactivos de inmunoensayo en una forma polimerizada. Dicho polipéptido SlpA o SlpA-SlpA comprende la totalidad de los elementos que podrían producir reacciones cruzadas, tales como la unidad SlpA misma, cualesquiera segmentos conectores o espaciadores, la hexahistidina u otros motivos de etiqueta e incluso las fracciones de marcaje, aunque en una forma inactivada. Debido al entrecruzamiento químico, dichos potenciales motivos con tendencia a la interferencia se presentan a los anticuerpos de reacción cruzada en una densidad de epítopos elevada, que resulta adecuada para la unión a los mismos y para, de esta manera, neutralizar dichos anticuerpos potencialmente interfirientes. Aparte de este efecto anti-interferencia, el polímero de

SlpA o SlpA-SlpA puede incluso presentar efectos ventajosos adicionales: como chaperón altamente polimérico debería poder adsorberse a áreas de superficie hidrofóbica de cualquier superficie sólida (tales como perlas, placas de microtitulación y paredes de tubo o recipiente) y, de esta manera, reducir la adsorción n o específica de los componentes inmunológicos esenciales. Además, puede contribuir a la solubilidad de otros componentes inmunológicos en virtud de sus características de chaperón, que podrían ser incluso más pronunciadas en su forma polimerizada.

Los Ejemplos ilustran la invención adicionalmente.

Ejemplo 1

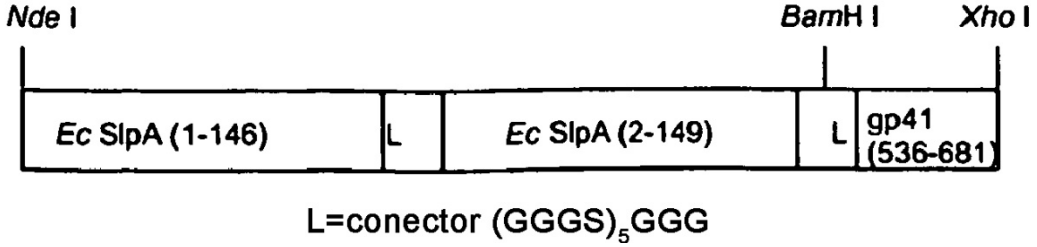
Clonación y purificación de los polipéptidos de fusión de SlpA y SlyD

Clonación de casetes de expresión

Basándose en el plásmido de expresión pET24a de Novagen (Madison, WI, USA), se obtuvo un casete de expresión codificante de los polipéptidos de fusión SlyD o SlpA. La secuencia del ectodominio de gp41 se obtuvo de la base de datos SwissProt. Se obtuvo de Medigenomix (Martinsried, Alemania) un gen sintético codificante de gp41 (aminoácidos 536 a 681) con una región conectora rica en glicinas fusionada en el mismo marco con el extremo N-terminal. Los sitios de restricción BamHI y XhoI se encontraban en los extremos 5' y 3' de la región codificante, respectivamente. De manera similar, se obtuvo de Medigenomix un gen sintético adicional codificante de dos unidades SlpA (residuos 1 a 146 y 2 a 149 según la SEC ID nº 1, SwissProt nº de acceso P0AEM0) conectadas mediante una región conectora rica en glicinas y que comprendía parte de una región conectora adicional en el extremo C-terminal. Los sitios de restricción NdeI y BamHI se encontraban en los extremos 5' y 3' de dicho casete, respectivamente. Los genes y los sitios de restricción se diseñaron para permitir la fusión en el mismo marco de SlpA-SlpA y el fragmento ectodominio de gp41 mediante ligación simple. Con el fin de evitar los procesos involuntarios de recombinación y para incrementar la estabilidad genética del casete de expresión en el huésped *E. coli*, se degeneraron las secuencias de nucleótidos codificantes de las unidades SlpA, así como las secuencias de nucleótidos codificantes de las regiones conectoras extendidas, es decir, se utilizaron diferentes combinaciones de codones para codificar secuencias de aminoácidos idénticas.

Se digirió el vector pET24a con NdeI y XhoI y se insertó el casete que comprendía SlpA en tándem fusionado en el mismo marco con el ectodominio de gp41 del VIH1, fragmento 536-681. De acuerdo con lo anterior se construyeron casetes de expresión que comprendían SlyD o SlyD en tándem en lugar de SlpA o SlpA en tándem, así como casetes de expresión que comprendían polipéptidos diana diferentes de gp41. Todas las variantes de polipéptido de fusión recombinante contenían una etiqueta hexahistidina C-terminal para facilitar la purificación y replegado asistidos por Ni-NTA. Se utilizaron técnicas QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA, USA) y de PCR estándares para generar mutaciones puntuales, variantes por deleción y extensión o sitios de restricción en los casetes de expresión respectivos.

El dibujo a continuación muestra un esquema del fragmento de ectodominio 536-681 de gp41 del VIH-1 que porta dos chaperones SlpA en tándem fusionados en el mismo marco con el extremo N-terminal del mismo.



L=conector $(GGGS)_5GGG$

Se secuenció la inserción del plásmido resultante y se encontró que codificaba la proteína de fusión deseada. La secuencia de aminoácidos completa se muestra en SEC ID nº 4. La secuencia de aminoácidos del conector L se muestra en SEC ID nº 17.

Purificación de SlpA, SlyD y proteínas de fusión que comprenden SlpA, SlyD y FkpA

Se purificó SlyD, SlpA y todos las variantes de proteína de fusión mediante la utilización de protocolos prácticamente idénticos. Las células de *E. coli* BL21 (DE3) que portan el plásmido de expresión pET24a particular se cultivaron a 37ºC en medio LB más canamicina (30 µg/ml) hasta una DO_{600} de 1,5, y se indujo la sobreexpresión citosólica mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) 1 mM. Tres horas después de la inducción, se recolectaron las células mediante centrifugación (20 minutos a 5.000 g), se congelaron y se almacenaron a -20ºC. Para la lisis celular, el pellet congelado se resuspendió en tampón fosfato sódico 50 mM frío (pH 8,0), GdmCl 7,0 M e imidazol 5 mM y la suspensión se agitó durante 2 h sobre hielo para completar la lisis celular. Tras centrifugar y filtrar (membrana de nitrato de celulosa, 0,45 µm/0,2 µm), el lisado se aplicó por una columna de Ni-NTA equilibrado con el tampón de lisis que incluía TCEP 5,0 mM. Se adaptó la etapa de lavado posterior a la proteína diana

respectiva, en un rango de imidazol de 5 a 15 mM en fosfato potásico 50 mM, pH 8,0, GdmCl 7,0 M y TCEP 5,0 mM. Se aplicaron por lo menos 10 a 15 volúmenes del tampón de lavado. A continuación, se sustituyó la solución de GdmCl por tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, KCl 100 mM, imidazol 10 mM y TCEP 5,0 mM con el fin de inducir el replegado conformacional de la proteína unida a matriz. Con el fin de evitar la reactivación de las proteasas purificadas simultáneamente, se añadió un cóctel inhibidor de proteasas (Complete® libre de EDTA, Roche) al tampón de replegado. Se aplicó un total de 15 a 20 volúmenes de tampón de replegado durante un periodo de una noche. A continuación, se eliminaron tanto el TCEP como el cóctel inhibidor Complete® libre de EDTA, mediante lavado con 3 a 5 volúmenes de columna de tampón de fosfato sódico 50 mM (pH 7,8), KCl 100 mM e imidazol 10 mM. A continuación se eluyó la proteína nativa con imidazol 250 mM en el mismo tampón. Se evaluaron las fracciones que contenían proteína para pureza utilizando 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 contenían proteína se agruparon y se concentraron en una celda Amicon (YM10).

Tras el protocolo de purificación y replegado acoplados, pudieron obtenerse rendimientos de aproximadamente 5 a 20 mg a partir de 1 g de células húmedas de *E. coli*, dependiendo de la proteína diana respectiva.

Ejemplo 2

Mediciones espectroscópicas

La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) es el método de elección para evaluar la estructura tanto secundaria como terciaria en las proteínas. La elipticidad en la región aromática (260 a 320 nm) informa de los contactos terciarios dentro de una proteína (es decir, la estructura globular de una proteína de plegado normal), mientras que la elipticidad en la región amida (190 a 250 nm) refleja los elementos repetitivos periódicos en el esqueleto de la proteína, es decir, la estructura secundaria.

Se llevaron a cabo mediciones de la concentración de proteína con un espectrofotómetro de doble haz Uvikon XL. Se determinaron los coeficientes de extinción molar (ε_{280}) mediante la utilización del procedimiento descrito por Pace, Protein Sci. 4, 2411-2423, 1995.

Se registraron los espectros de CD de UV próximo con un espectropolarímetro Jasco-720 con un soporte para celdas termostatizado y se convirtieron en la elipticidad residual media. El tampón era fosfato potásico 50 a 150 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM. El camino óptico era de 0,5 cm o 1,0 cm; la concentración de proteína era de 20 a 500 µM. La anchura de banda era de 2 nm, la velocidad de escaneo era de 50 nm/min. a una resolución de 0,5 nm y la respuesta era de 1 o 2 s. Con el fin de mejorar la proporción de señal a ruido, se midieron los espectros nueve veces y se promediaron. Se registraron los espectros de CD de UV lejano con un espectropolarímetro Jasco-720 con un soporte para celdas termostatizado y se convirtieron en la elipticidad residual media. El tampón era fosfato potásico 10 mM, pH 7,5, KCl 25 mM, EDTA 0,5 mM. El camino óptico era de 0,2 cm; la concentración de proteína era de 2,5 a 20 µM. La anchura de banda era de 2 nm, la velocidad de escaneo era de 50 nm/min. a una resolución de 0,5 nm y la respuesta era de 1 o 2 s. Con el fin de mejorar la proporción de señal a ruido, se midieron los espectros nueve veces y se promediaron.

Ejemplo 3

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

Se modificaron los grupos ε-amino de la lisina de los polipéptidos de fusión a concentraciones de proteína de entre 10 y 20 mg/ml con marcajes de biotina y rutenio activados por N-hidroxisuccinimida, respectivamente. La proporción de marcaje/proteína variaba entre 2:1 y 5:1 (moles:moles), dependiendo de la proteína de fusión respectiva. El tampón de reacción era fosfato potásico 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 hasta una concentración final de 10 mM. Para evitar la inactivación hidrolíticas de los marcajes, se prepararon las soluciones madre respectivas en DMSO seco (calidad seccosolv, Merck, Alemania). Las concentraciones de DMSO de hasta 15% en el tampón de reacción resultan bien toleradas por todas las proteínas de fusión estudiadas. Tras la reacción de acoplamiento, se eliminó el marcaje libre no reaccionado mediante el paso del conjugado de la proteína en burto por una columna de filtración en gel (Superdex 200 HiLoad).

Ejemplo 4

Reactividad inmunológica de las proteínas de fusión de polipéptido

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

La detección de señal en Elecsys® 2010 se basa en la electroquimioluminiscencia. El conjugado de biotina (es decir,

el antígeno de captura) se inmoviliza sobre la superficie de una perla magnética recubierta de estreptavidina, mientras que el antígeno de detección porta un catión rutenio acomplejado (que cambia entre los estados redox 2+ y 3+) como fracción de señalización. En presencia de un analito inmunoglobulina específico, el complejo de rutenio cromogénico se puentea con la fase sólida y emite luz a 620 nm tras la excitación en un electrodo de platino. La salida de señal se expresa en unidades lumínicas arbitrarias.

Se utilizaron polipéptidos de fusión que contenían antígeno gG1 del VSH-1 (aminoácidos 26 a 189, ver las SEC ID nº 7 y nº 8) como secuencia antigénica específica de VHS-1 en el ensayo para tanto el antígeno de captura como el de detección. El antígeno gG1 se fusionó con SlpA o con SlyD. En el inmunoensayo de tipo sándwich de doble antígeno, se aplica un conjugado de SlpA-gG1 (26-189)-biotina conjuntamente con el conjugado de SlpA-gG1 (26-189)-complejo de rutenio (invención) a una concentración de 100 ng/ml cada uno. Además, se aplica un conjugado de SlpA-gG1 (26-189)-biotina conjuntamente con el conjugado de SlyD-gG1 (26-189)-complejo de rutenio (comparación) a una concentración de 100 ng/ml cada uno.

Los conjugados de biotina y de rutenio de las variantes del polipéptido de fusión de gG1 (26-189) se evaluaron para su reactividad contra los sueros positivos para anti-VHS-1 a concentraciones de 100 ng/ml cada uno. En todas las mediciones, se implementaron SlyD-SlyD químicamente polimerizado no marcado en el tampón de reacción como sustancia anti-interferencia para evitar reacciones cruzadas inmunológicas mediante la unidad de fusión de chaperón. Como controles se utilizaron once sueros humanos negativos para anti-VHS-1.

Para determinar la termotolerancia de las proteínas de fusión, se sometió SlyD-gG1 y SlpA-gG1 a condiciones térmicas severas, de la manera siguiente: Se incubó SlyD-gG1 y SlpA-gG1 (proteínas en fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM) durante la noche a 60ºC. La concentración de los conjugados de gG1-biotina era de aproximadamente 1,3 mg/ml cada uno; la concentración de los conjugados de gG1-rutenio era de aproximadamente 0,6 mg/ml cada uno. A continuación, se evaluaron las muestras sometidas a estrés térmico para su actividad inmunológica residual en un analizador automático Elecsys® 2010 bajo las condiciones experimentales indicadas anteriormente. Como referencia se utilizaron muestras no retadas (almacenadas entre 2ºC y 8ºC) de SlyD-gG1 y SlpA-gG1.

En la Tabla 1 se muestra el resultado de los experimentos (figura 9).

La Tabla 1 ilustra la reactividad inmunológica de SlpA-gG1 (26-189) y de SlyD-gG1 (26-189) con sueros humanos positivos para anti-VSH-1 y negativos para anti-VSH-1 en un analizador automático Elecsys® tal como se indica en el Ejemplo 4. La Tabla 1 demuestra el rendimiento de ambas variantes de antígeno antes y después de un tratamiento térmico severo durante la noche a 60ºC. El resultado de los experimentos demuestra claramente la superioridad de SlpA-gG1 (26-189) bajo estrés térmico en comparación con SlyD-gG1 (26-189) bajo estrés térmico de dos maneras diferentes. En primer lugar, la recuperación de la señal con sueros positivos para anti-VSH-1 (mitad superior de la Tabla 1) era significativamente superior con el polipéptido de fusión de SlpA sometido a estrés térmico. En segundo lugar, el incremento de la señal de fondo no específica con sueros negativos para anti-VSH-1 (mitad inferior de la Tabla 1) era significativamente inferior con el polipéptido de fusión de SlpA sometido a estrés térmico. Los presentes inventores observaron un considerable incremento de la señal de fondo tras el tratamiento térmico de los polipéptidos de fusión de SlyD (ver la columna derecha, incremento de aproximadamente 100% a 900% de la señal de fondo). Sin embargo, al utilizar polipéptidos de fusión de SlpA según la invención, el incremento de la señal de fondo tras el estrés térmico es prácticamente nulo, es decir, es inferior a 20% en todos los casos excepto uno. En ese caso concreto (muestra de suero Trina 07/06-533) se observó un incremento de la señal de fondo de 48%. La misma muestra (Trina 07/06-533) mostró un incremento de la señal de fondo superior a 800% al utilizar en su lugar el polipéptido de fusión de SlyD. Lo anterior demuestra que incluso con muestras difíciles que producen inherentemente señales de fondo ligeramente elevadas, los polipéptidos de fusión de SlpA pueden reducir sustancialmente la señal de fondo. Las señales de fondo bajas son altamente deseables en el desarrollo de los inmunoensayos porque permiten al fabricante fijar un valor de corte bajo. Generalmente, las señales de fondo reducidas resultan necesarias para obtener un rendimiento de ensayo incrementado con respecto a la sensibilidad. El motivo es que las muestras que rinden una señal superior al valor de corte se consideran positivas (es decir, las muestras se supone que contienen el analito a estudio); las muestras que rinden una señal inferior al valor de corte se consideran negativas. Por lo tanto, resulta fácil de entender por qué se tiene una fuerte necesidad de un valor de corte bajo: cuanto más bajo es el valor de corte, más alta es la probabilidad de que las muestras que contienen concentraciones de analito bajas (y concomitantemente rindan señales bajas) sean correctamente identificadas como positivas bajas. De esta manera, puede incrementarse la sensibilidad de un inmunoensayo mediante la reducción de la señal de fondo que se origina inherentemente a partir de sus componentes inmunológicos. La utilización de SlpA como ayudante de plegado contribuye claramente de esta manera a mejorar y garantizar la sensibilidad a largo de plazo de un inmunoensayo.

En resumen, los polipéptidos de fusión que contienen SlpA incrementan tanto la estabilidad como la solubilidad de los polipéptidos diana fusionados, en particular bajo condiciones críticas (tales como el estrés térmico), que habitualmente comprometería el plegado negativo y conduciría a procesos de agregación. Brevemente, SlpA es un ayudante de plegado excelente que protege la integridad de sus proteínas cliente incluso bajo condiciones muy desfavorables, facilita el replegado de las mismas en una conformación activa y las mantiene en solución. La fusión

con SlpA, o más simplemente, la adición de SlpA es, por lo tanto, un medio excelente para estabilizar las moléculas diana en las formulaciones de proteínas destinadas a fines diagnósticos y otros fines biotecnológicos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH (y Hoffmann La-Roche AG) Roche Diagnostics GmbH (y Hoffmann La-Roche AG)

<120> SlpA como herramienta para la tecnología recombinante de proteínas y enzimas

<130> 24705 EP1-IR

<150> EP 08009537.5
<151> 2008-05-26

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 149
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 1

```
Met Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr
1               5                   10                  15

Leu Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly
            20                  25                  30

Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu
        35                  40                  45

Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser
    50                  55                  60

Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly
                85                  90                  95

Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val
            100                 105                 110

Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro
        115                 120                 125
Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp
    130                 135                 140

Pro Ala Leu Glu Ala
145
```

<210> 2
<211> 153
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> E: coli SlpA 2-148 con etiqueta de His

<400> 2

```
Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr Leu
1               5                   10                  15

Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly Lys
            20                  25                  30

Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser Leu
    50                  55                  60

Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln Tyr
65                  70                  75                  80

Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly Ala
                85                  90                  95

Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val Ile
            100                 105                 110

Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro Leu
        115                 120                 125

Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp Pro
    130                 135                 140

Ala Leu Glu His His His His His His
145                 150
```

<210> 3
<211> 323
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido de fusión SlpA-gp41 (VIH)

<400> 3

```
Met Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr
1               5                  10                  15

Leu Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly
            20                  25                  30

Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu
        35                  40                  45

Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser
    50                  55                  60

Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly
                85                  90                  95

Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val
            100                 105                 110

Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp
    130                 135                 140

Pro Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg
                165                 170                 175
```

```
Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala
            180                 185                 190

Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys
        195                 200                 205

Gln Leu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln
    210                 215                 220

Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr
225                 230                 235                 240

Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile
                245                 250                 255

Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr
            260                 265                 270

Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu
        275                 280                 285

Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp
    290                 295                 300

Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Leu Glu His His His
305                 310                 315                 320

His His His
```

<210> 4
<211> 494
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Polipéptido de fusión SlpA en tándem con gp41

<400> 4

```
Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu
        35                  40                  45

Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser
    50                  55                  60

Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly
                85                  90                  95

Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val
            100                 105                 110

Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp
    130                 135                 140

Pro Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn
                165                 170                 175

Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr Leu Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr
            180                 185                 190

Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly
        195                 200                 205

Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys
    210                 215                 220

Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly
225                 230                 235                 240

Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met
                245                 250                 255
```

```
Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met
            260                 265                 270

Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser
        275                 280                 285

Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe
    290                 295                 300

Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp Pro Ala Leu Glu Ala Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                325                 330                 335

Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly
            340                 345                 350

Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln
        355                 360                 365

His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Gln Leu Gln Ala Arg
    370                 375                 380

Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile
385                 390                 395                 400

Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn
                405                 410                 415

Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr
            420                 425                 430

Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
        435                 440                 445

Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
    450                 455                 460

Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile
465                 470                 475                 480
```

Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Leu Glu His His His His His His
485 490

<210> 5
<211> 342
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de fusión SlyD-gp41 (HIV)

<400> 5

```
Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
1               5                  10                  15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
            20                  25                  30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
        35                  40                  45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
    50                  55                  60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
65                  70                  75                  80

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
                85                  90                  95

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
            100                 105                 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
        115                 120                 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
    130                 135                 140

Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
145                 150                 155                 160
```

```
Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                165                 170                 175

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val
            180                 185                 190

Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Asn Asn Glu
        195                 200                 205

Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp
    210                 215                 220

Gly Thr Lys Gln Leu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile
                245                 250                 255

Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu
            260                 265                 270

Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile
        275                 280                 285

Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
    290                 295                 300

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala
305                 310                 315                 320

Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Leu Glu
                325                 330                 335

His His His His His His
            340
```

<210> 6
<211> 535
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de fusión SlyD en tándem-gp41

<400> 6

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
1 5 10 15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
20 25 30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
35 40 45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
50 55 60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
65 70 75 80

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
85 90 95

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
100 105 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
115 120 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
130 135 140

Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
145 150 155 160

Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
165 170 175

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Lys Val Ala Lys
180 185 190

Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg Thr Glu Asp Gly Val
195 200 205

Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tyr Leu His Gly
210 215 220

```
His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly His Glu
225                 230                 235                 240

Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala Asn Asp Ala Tyr Gly
                245                 250                 255

Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Asp Val Phe Met
            260                 265                 270

Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu Ala Glu Thr Asp
        275                 280                 285

Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp Asp His Val
    290                 295                 300

Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu Lys Phe Asn
305                 310                 315                 320

Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala His
                325                 330                 335

Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His Asp
            340                 345                 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
        355                 360                 365

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu
    370                 375                 380

Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala Ile Glu
385                 390                 395                 400

Ala Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Gln Leu
                405                 410                 415

Gln Ala Arg Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu
            420                 425                 430

Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val
        435                 440                 445
```

```
Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn
    450                 455                 460

Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser
465                 470                 475                 480

Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
                485                 490                 495

Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp
            500                 505                 510

Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr His Gly His Asp His Asp His
        515                 520                 525

Asp His His His His His His
    530                 535
```

<210> 7
<211> 343
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de fusión SlpA-gG1 (VHS)

<400> 7

```
Met Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr
1               5                   10                  15

Leu Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly
            20                  25                  30

Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu
        35                  40                  45

Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser
    50                  55                  60

Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln
65                  70                  75                  80
```

```
Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly
                85                  90                  95

Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val
            100                 105                 110

Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp
    130                 135                 140

Pro Ala Leu Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
145                 150                 155                 160

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro Thr Asn Val Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Thr Gln Pro Gln Leu Gln Thr Thr Gly Arg Pro Ser His Glu
            180                 185                 190

Ala Pro Asn Met Thr Gln Thr Gly Thr Thr Asp Ser Pro Thr Ala Ile
        195                 200                 205

Ser Leu Thr Thr Pro Asp His Thr Pro Pro Met Pro Ser Ile Gly Leu
    210                 215                 220

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gly Asp Gly Glu His Leu Glu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Asp Gly Thr Arg Asp Thr Leu Pro Gln Ser Pro Gly Pro Ala
                245                 250                 255

Phe Pro Leu Ala Glu Asp Val Glu Lys Asp Lys Pro Asn Arg Pro Val
            260                 265                 270

Val Pro Ser Pro Asp Pro Asn Asn Ser Pro Ala Arg Pro Glu Thr Ser
        275                 280                 285

Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Ile Ile Gly Pro Leu Ala Thr Arg Pro
    290                 295                 300
```

```
Thr Thr Arg Leu Thr Ser Lys Gly Arg Pro Leu Val Pro Thr Pro Gln
305                 310                 315                 320

His Thr Pro Leu Phe Ser Phe Leu Thr Ala Ser Pro Ala Leu Asp Leu
                325                 330                 335

Glu His His His His His His
            340
```

<210> 8
<211> 360
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido de fusión SlyD-gG1 (HSV)

<400> 8

```
Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
1               5                   10                  15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
            20                  25                  30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
        35                  40                  45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
    50                  55                  60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
65                  70                  75                  80

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
                85                  90                  95

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
            100                 105                 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
        115                 120                 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
    130                 135                 140
```

```
Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
145                 150                 155                 160

Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                165                 170                 175

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro Thr Asn Val
            180                 185                 190

Ser Ser Thr Thr Gln Pro Gln Leu Gln Thr Thr Gly Arg Pro Ser His
        195                 200                 205

Glu Ala Pro Asn Met Thr Gln Thr Gly Thr Thr Asp Ser Pro Thr Ala
    210                 215                 220

Ile Ser Leu Thr Thr Pro Asp His Thr Pro Pro Met Pro Ser Ile Gly
225                 230                 235                 240

Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gly Asp Gly Glu His Leu
                245                 250                 255

Glu Gly Gly Asp Gly Thr Arg Asp Thr Leu Pro Gln Ser Pro Gly Pro
            260                 265                 270

Ala Phe Pro Leu Ala Glu Asp Val Glu Lys Asp Lys Pro Asn Arg Pro
        275                 280                 285

Val Val Pro Ser Pro Asp Pro Asn Asn Ser Pro Ala Arg Pro Glu Thr
    290                 295                 300

Ser Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Ile Ile Gly Pro Leu Ala Thr Arg
305                 310                 315                 320

Pro Thr Thr Arg Leu Thr Ser Lys Gly Arg Pro Leu Val Pro Thr Pro
                325                 330                 335

Gln His Thr Pro Leu Phe Ser Phe Leu Thr Ala Ser Pro Ala Leu Asp
            340                 345                 350

Leu Glu His His His His His His
        355                 360
```

<210> 9
<211> 199
<212> PRT
<213> Pasteurella multocida

<400> 9

```
Met Lys Ile Ala Lys Asn Val Val Val Ser Ile Ala Tyr Gln Val Arg
1               5                  10                  15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ala Pro Val Asn Gln Pro Leu
            20                  25                  30

Glu Tyr Leu Gln Gly His Asn Asn Leu Val Ile Gly Leu Glu Asn Ala
        35                  40                  45

Leu Glu Gly Lys Ala Val Gly Asp Lys Phe Glu Val Arg Val Lys Pro
    50                  55                  60

Glu Glu Ala Tyr Gly Glu Tyr Asn Glu Asn Met Val Gln Arg Val Pro
65                  70                  75                  80

Lys Asp Val Phe Gln Gly Val Asp Glu Leu Val Val Gly Met Arg Phe
                85                  90                  95

Ile Ala Asp Thr Asp Ile Gly Pro Leu Pro Val Val Ile Thr Glu Val
            100                 105                 110

Ala Glu Asn Asp Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
        115                 120                 125

Glu Leu Leu Phe Ser Val Glu Val Val Ala Thr Arg Glu Ala Thr Leu
    130                 135                 140

Glu Glu Ile Ala His Gly His Ile His Gln Glu Gly Gly Cys Cys Gly
145                 150                 155                 160

Gly His His His Asp Ser Asp Glu Glu Gly His Gly Cys Gly Cys Gly
                165                 170                 175

Ser His His His His Glu His Glu His His Ala His Asp Gly Cys Cys
            180                 185                 190
Gly Asn Gly Gly Cys Lys His
        195
```

<210> 10
<211> 156
<212> PRT
<213> Pasteurella multocida

<400> 10

```
Met Lys Ile Ala Lys Asn Val Val Val Ser Ile Ala Tyr Gln Val Arg
1               5                  10                  15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ala Pro Val Asn Gln Pro Leu
            20                  25                  30

Glu Tyr Leu Gln Gly His Asn Asn Leu Val Ile Gly Leu Glu Asn Ala
        35                  40                  45

Leu Glu Gly Lys Ala Val Gly Asp Lys Phe Glu Val Arg Val Lys Pro
    50                  55                  60

Glu Glu Ala Tyr Gly Glu Tyr Asn Glu Asn Met Val Gln Arg Val Pro
65                  70                  75                  80

Lys Asp Val Phe Gln Gly Val Asp Glu Leu Val Val Gly Met Arg Phe
                85                  90                  95

Ile Ala Asp Thr Asp Ile Gly Pro Leu Pro Val Val Ile Thr Glu Val
            100                 105                 110

Ala Glu Asn Asp Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
        115                 120                 125

Glu Leu Leu Phe Ser Val Glu Val Val Ala Thr Arg Glu Ala Thr Leu
    130                 135                 140

Glu Glu Ile Ala His Gly His Ile His Gln Glu Gly
145                 150                 155
```

<210> 11
<211> 270
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 11

```
Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
1               5                  10                  15

Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
            20                  25                  30

Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
        35                  40                  45

Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
    50                  55                  60

Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
65                  70                  75                  80

Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln
                85                  90                  95

Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser
            100                 105                 110

Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
        115                 120                 125

Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
    130                 135                 140

Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
145                 150                 155                 160

Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile
                165                 170                 175

Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
            180                 185                 190

Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn
        195                 200                 205

Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
```

210 215 220

Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
225 230 235 240

Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
245 250 255

Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys
260 265 270

<210> 12
<211> 245
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 12
Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ser Ala Lys Lys
                245
```

<210> 13
<211> 241
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> EBVNA-1 401-641, cisteínas sustituidas por alaninas

<400> 13

```
Gly Arg Arg Pro Phe Phe His Pro Val Gly Glu Ala Asp Tyr Phe Glu
1               5                   10                  15

Tyr His Gln Glu Gly Gly Pro Asp Gly Glu Pro Asp Val Pro Pro Gly
            20                  25                  30

Ala Ile Glu Gln Gly Pro Ala Asp Asp Pro Gly Glu Gly Pro Ser Thr
        35                  40                  45

Gly Pro Arg Gly Gln Gly Asp Gly Gly Arg Arg Lys Lys Gly Gly Trp
    50                  55                  60
```

```
Phe Gly Lys His Arg Gly Gln Gly Gly Ser Asn Pro Lys Phe Glu Asn
65                  70                  75                  80

Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Ser His Val Glu Arg
                85                  90                  95

Thr Thr Asp Glu Gly Thr Trp Val Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly
            100                 105                 110

Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile
        115                 120                 125

Pro Gln Ala Arg Leu Thr Pro Leu Ser Arg Leu Pro Phe Gly Met Ala
    130                 135                 140

Pro Gly Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Ala
145                 150                 155                 160

Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys
                165                 170                 175

Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Ala Asn
            180                 185                 190

Ile Arg Val Thr Val Ala Ser Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro
        195                 200                 205

Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly
    210                 215                 220

Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly Asp Gly Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln
225                 230                 235                 240

Glu
```

<210> 14
<211> 176
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> EBV p18, 1-176, cisteínas sustituidas por alaninas

<400> 14

```
Met Ala Arg Arg Leu Pro Lys Pro Thr Leu Gln Gly Arg Leu Glu Ala
1               5                   10                  15

Asp Phe Pro Asp Ser Pro Leu Leu Pro Lys Phe Gln Glu Leu Asn Gln
            20                  25                  30

Asn Asn Leu Pro Asn Asp Val Phe Arg Glu Ala Gln Arg Ser Tyr Leu
        35                  40                  45

Val Phe Leu Thr Ser Gln Phe Ala Tyr Glu Glu Tyr Val Gln Arg Thr
    50                  55                  60

Phe Gly Val Pro Arg Arg Gln Arg Ala Ile Asp Lys Arg Gln Arg Ala
65                  70                  75                  80

Ser Val Ala Gly Ala Gly Ala His Ala His Leu Gly Gly Ser Ser Ala
                85                  90                  95

Thr Pro Val Gln Gln Ala Gln Ala Ala Ala Ser Ala Gly Thr Gly Ala
            100                 105                 110

Leu Ala Ser Ser Ala Pro Ser Thr Ala Val Ala Gln Ser Ala Thr Pro
        115                 120                 125

Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln
                165                 170                 175
```

<210> 15
<211> 72
<212> PRT
<213> Virus herpes humano 4

<400> 15

```
Ala Val Ala Gln Ser Ala Thr Pro Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser
            20                  25                  30

Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala
        35                  40                  45

Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala
    50                  55                  60

Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln
65                  70
```

<210> 16
<211> 162
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> EBV p23, 1-162, cisteínas sustituídas por alaninas

<400> 16

```
Met Ser Ala Pro Arg Lys Val Arg Leu Pro Ser Val Lys Ala Val Asp
1               5                   10                  15

Met Ser Met Glu Asp Met Ala Ala Arg Leu Ala Arg Leu Glu Ser Glu
            20                  25                  30

Asn Lys Ala Leu Lys Gln Gln Val Leu Arg Gly Gly Ala Ala Ala Ser
        35                  40                  45

Ser Thr Ser Val Pro Ser Ala Pro Val Pro Pro Pro Glu Pro Leu Thr
    50                  55                  60

Ala Arg Gln Arg Glu Val Met Ile Thr Gln Ala Thr Gly Arg Leu Ala
65                  70                  75                  80

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

Gly Val Thr Thr Arg Asn Glu Met Glu Asn Ile Leu Gln Asn Leu Thr
            100                 105                 110

Leu Arg Ile Gln Val Ser Met Leu Gly Ala Lys Gly Gln Pro Ser Pro
```

115 120 125

Gly Glu Gly Thr Arg Pro Arg Glu Ser Asn Asp Pro Asn Ala Thr Arg
130 135 140

Arg Ala Arg Ser Arg Ser Arg Gly Arg Glu Ala Lys Lys Val Gln Ile
145 150 155 160

Ser Asp

<210> 17
<211> 23
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Conector artificial para el casete de expresión para proteínas de fusión

<400> 17
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
20

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ADN recombinante, codificante de una proteína de fusión, que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido diana y cadena arriba o cadena abajo del mismo por lo menos una secuencia de nucleótidos codificante de un chaperón proteína A de tipo SlyD (SlpA) de *E. coli* que comprende el segmento de unión a polipéptido o dominio IF de SlpA, en el que las proteínas de unión FK506 (FKBP) se excluyen como polipéptidos diana, y en el que la estabilidad y solubilidad del polipéptido diana fusionado se incrementa bajo condiciones críticas, tales como el estrés térmico, provocando de esta manera que el polipéptido diana resulte menos susceptible a la agregación inducida por calor.

2. Vector de expresión que comprende operablemente ligado una molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1.

3. Célula huésped transformada con un vector de expresión según la reivindicación 2.

4. Método de producción de una proteína de fusión, comprendiendo dicho método las etapas de cultivar células huésped según la reivindicación 3:

b) expresión de dicha proteína de fusión,
c) purificación de dicha proteína de fusión y
d) replegado en una conformación soluble e inmunorreactiva.

5. Proteína de fusión producida recombinantemente que comprende por lo menos una secuencia polipeptídica que corresponde al chaperón proteína A de tipo SlyD (SlpA) de *E. coli* que comprende el segmento de unión a polipéptido o el dominio IF de SlpA, y por lo menos una secuencia polipeptídica correspondiente a un polipéptido diana en el que las proteínas de unión FK506 (FKBP) se excluyen como polipéptidos diana, y en el que la estabilidad y solubilidad del polipéptido diana fusionado se incrementa bajo condiciones críticas, tales como el estrés térmico, provocando de esta manera que el polipéptido diana resulte menos susceptible a la agregación inducida por calor.

6. Utilización de una proteína de fusión producida recombinantemente según la reivindicación 5, como pareja de unión en un inmunoensayo.

7. Utilización de una proteína de fusión producida recombinantemente según la reivindicación 5, como medio para la reducción de interferencias en un inmunoensayo.

8. Utilización de una proteína de fusión producida recombinantemente según la reivindicación 5, como inmunógeno.

9. Utilización de una proteína de fusión producida recombinantemente según la reivindicación 5, en la producción de una vacuna.

10. Composición que comprende una proteína de fusión producida recombinantemente según la reivindicación 5, y un recipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Método para la detección de anticuerpos específicos para un analito en una muestra aislada, comprendiendo dicho método:

a) formar una mezcla de inmunorreacción mediante la mezcla de una muestra de líquido corporal con una proteína de fusión según la reivindicación 5,
b) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos contra dicho analito presente en la muestra de líquido corporal inmunorreaccionen con dicha proteína de fusión para formar un producto de inmunorreacción, y
c) detectar la presencia de dicho producto de inmunorreacción.

12. Utilización de una proteína de fusión según la reivindicación 5 en un método para la detección de anticuerpos contra un analito en una muestra aislada.

13. Kit de reactivos para la detección de anticuerpos contra un analito, que contiene una proteína de fusión según la reivindicación 5.

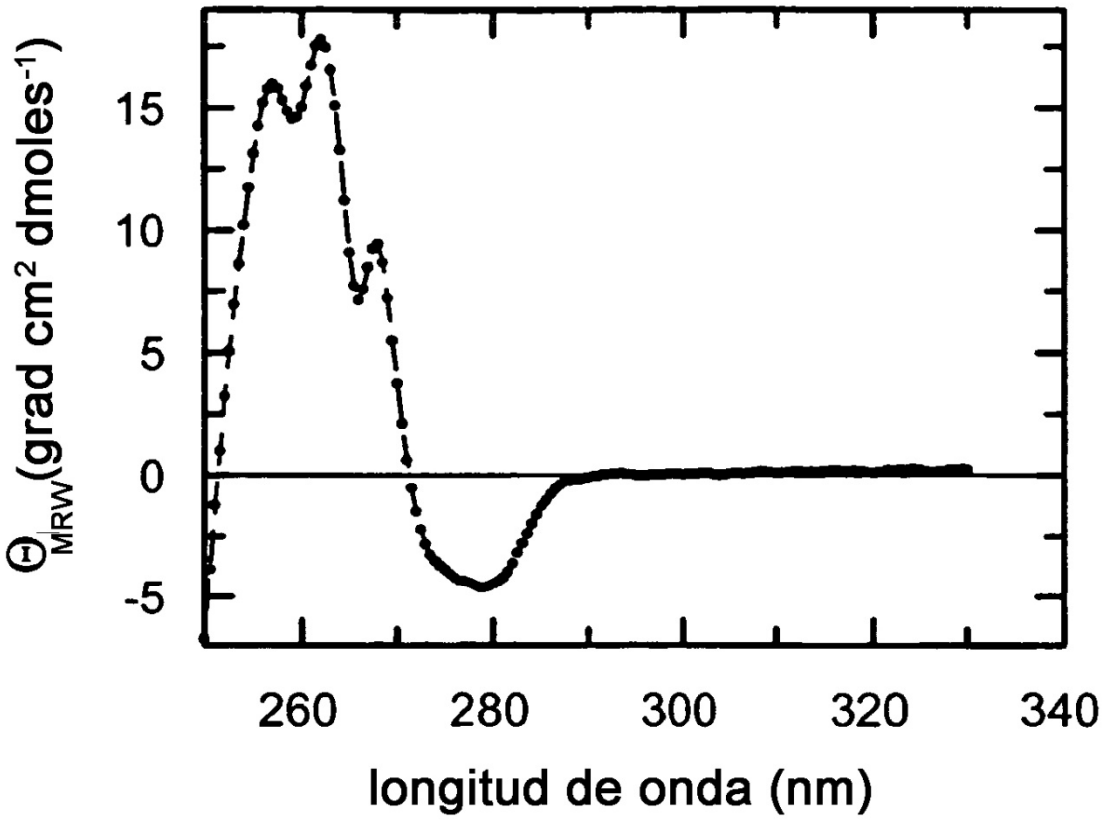

Θ_{MRW}(grad cm^2 dmoles^{-1})
15
10
5
0
-5
260
280
300
320
340
longitud de onda (nm)

Figura 1/9

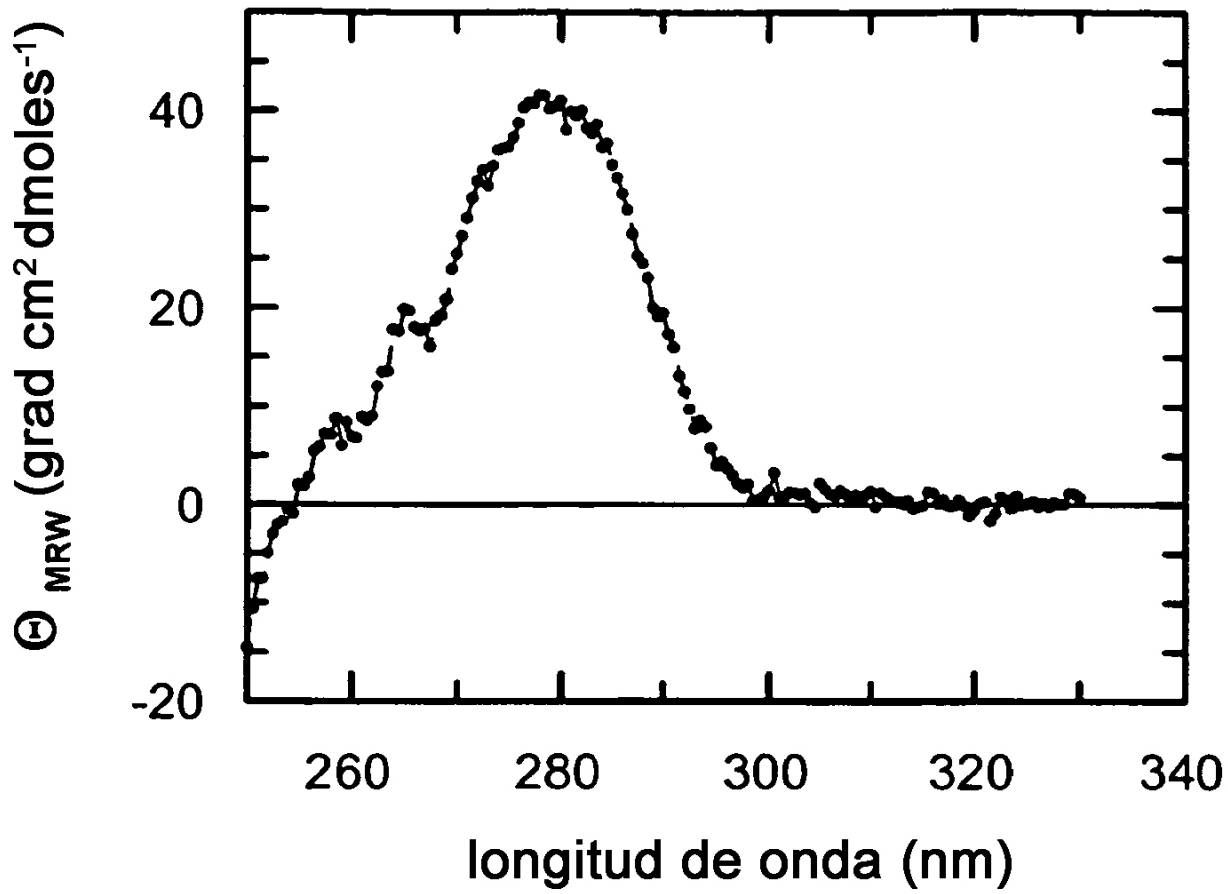

Θ MRW (grad cm2 dmoles-1)
40
20
0
-20
260
280
300
320
340
longitud de onda (nm)

Figura 2/9

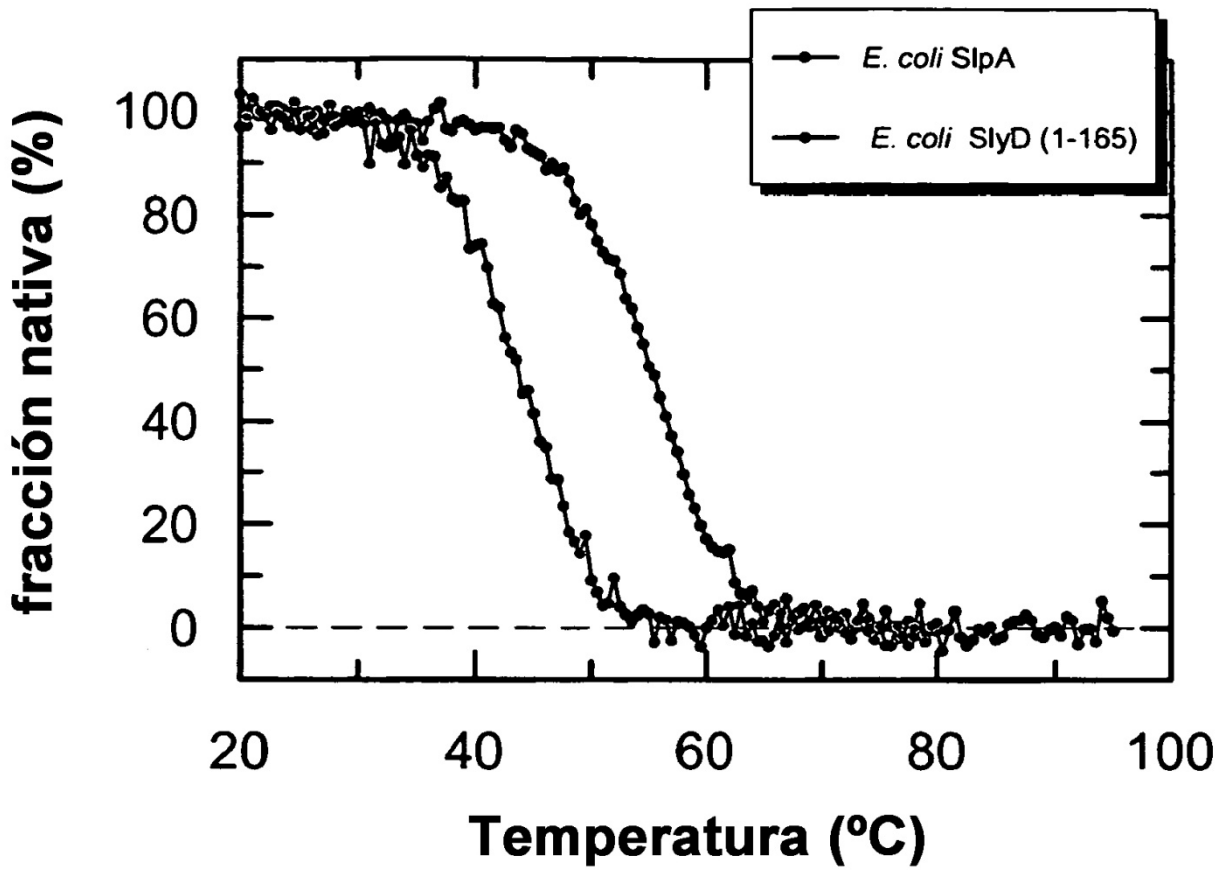

E. coli SlpA
E. coli SlyD (1-165)
fracción nativa (%)
100
80
60
40
20
0
20
40
60
80
100
Temperatura (ºC)

Figura 3/9

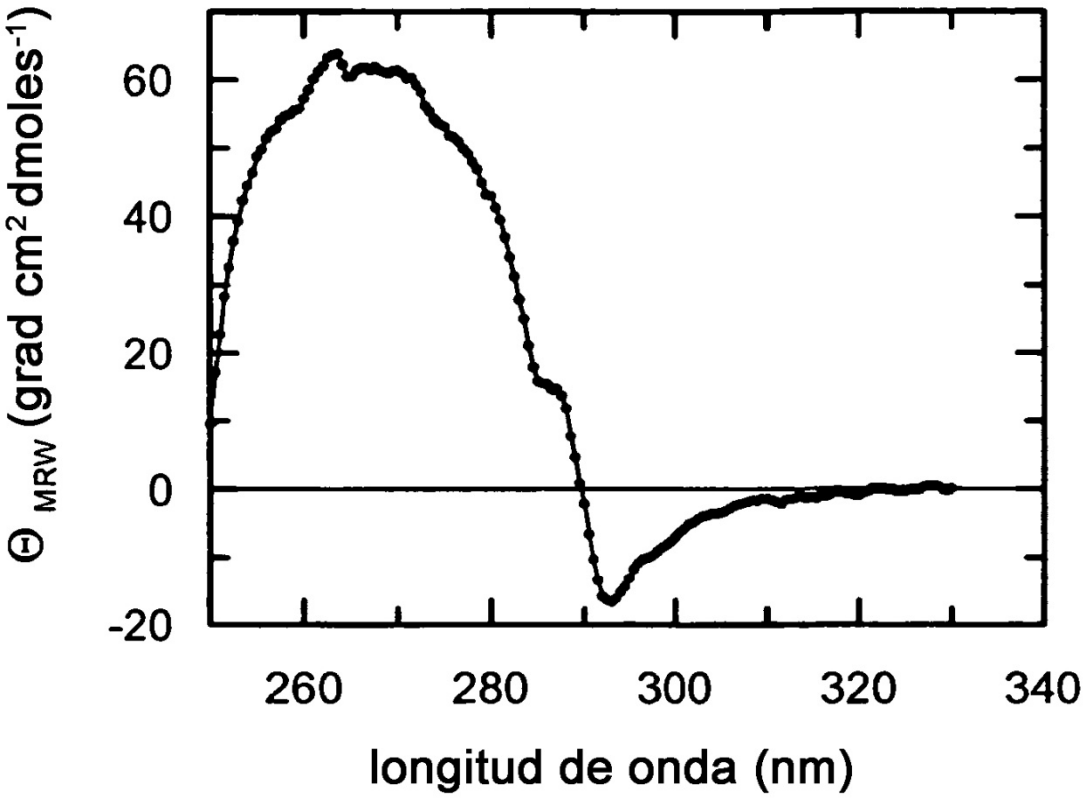

Θ MRW (grad cm2 dmoles-1)
60
40
20
0
-20
260
280
300
320
340
longitud de onda (nm)

Figura 4/9

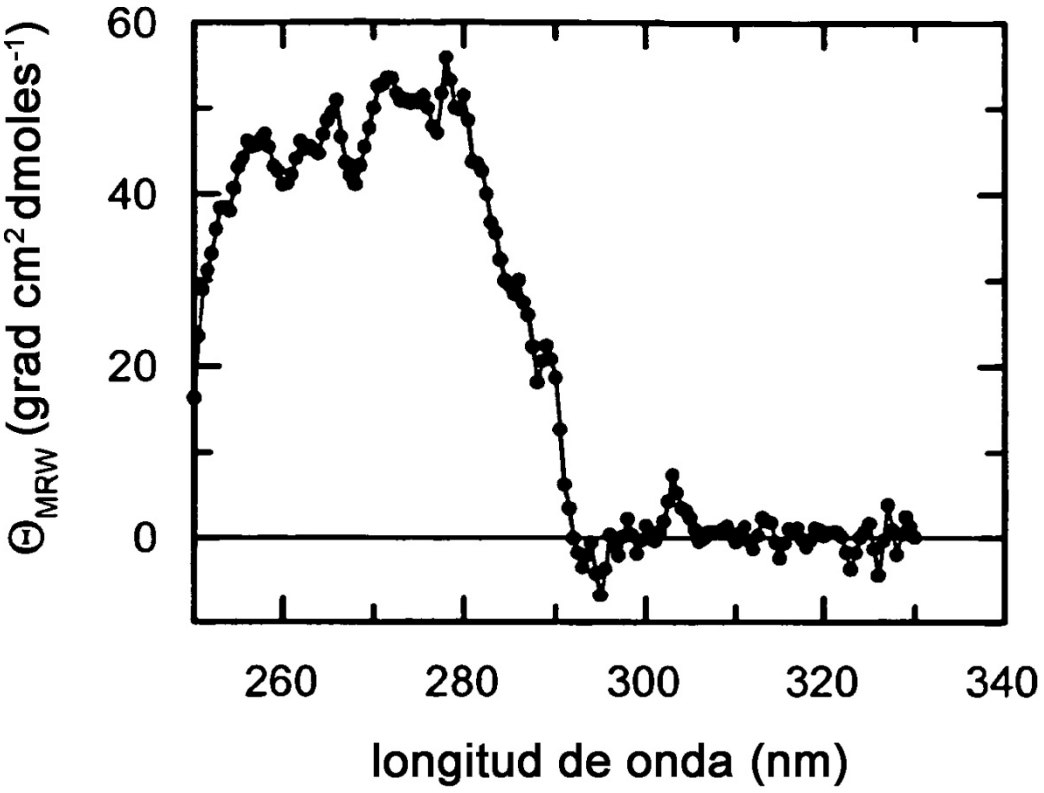
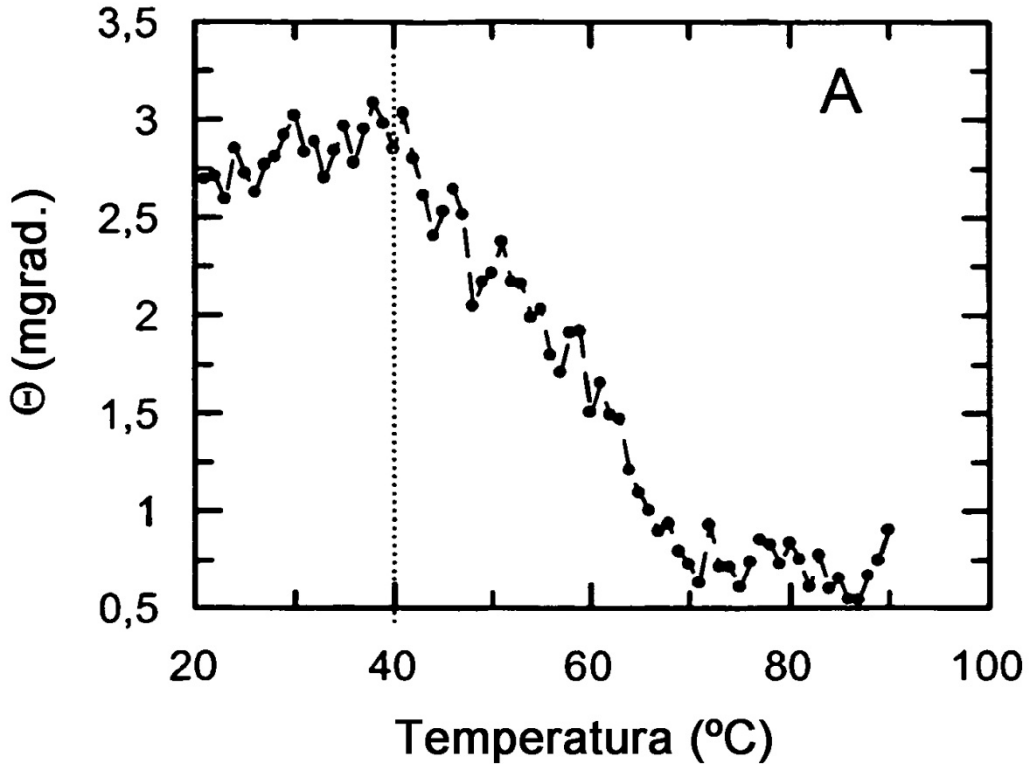

60
40
20
0
Θ_{MRW} (grad cm^2 dmoles^{-1})
260
280
300
320
340
longitud de onda (nm)

Figura 5/9


A
Θ (mgrad.)
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
20
40
60
80
100
Temperatura (ºC)

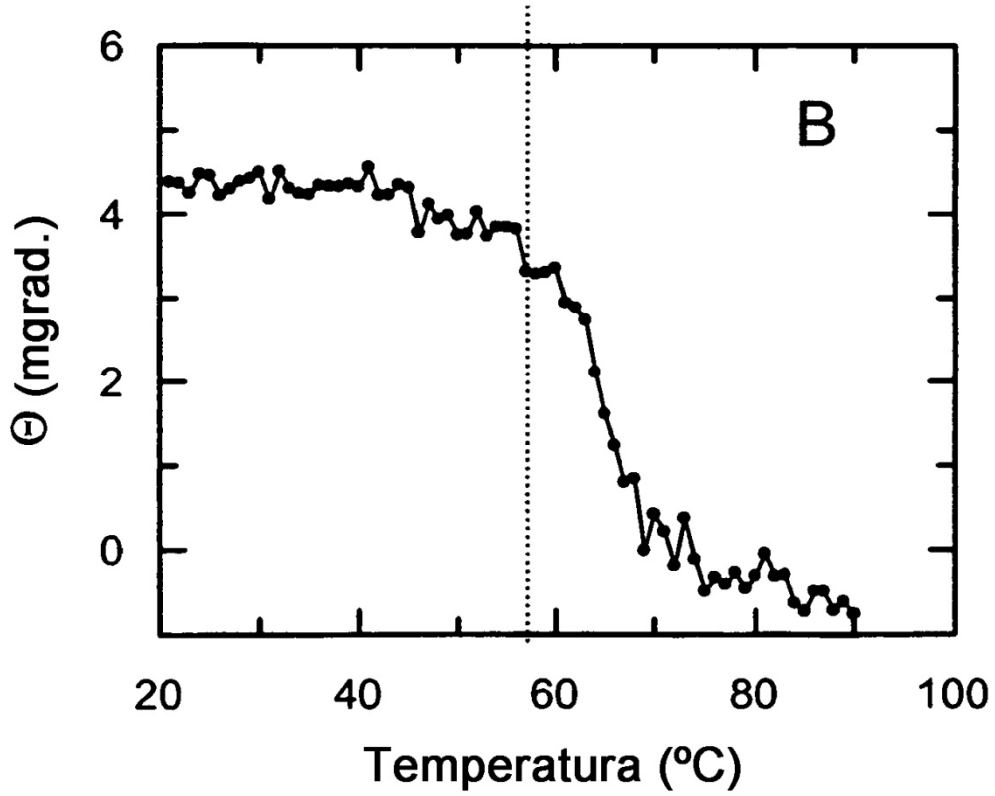

B
Θ (mgrad.)
6
4
2
0
20
40
60
80
100
Temperatura (ºC)

Figura 6/9

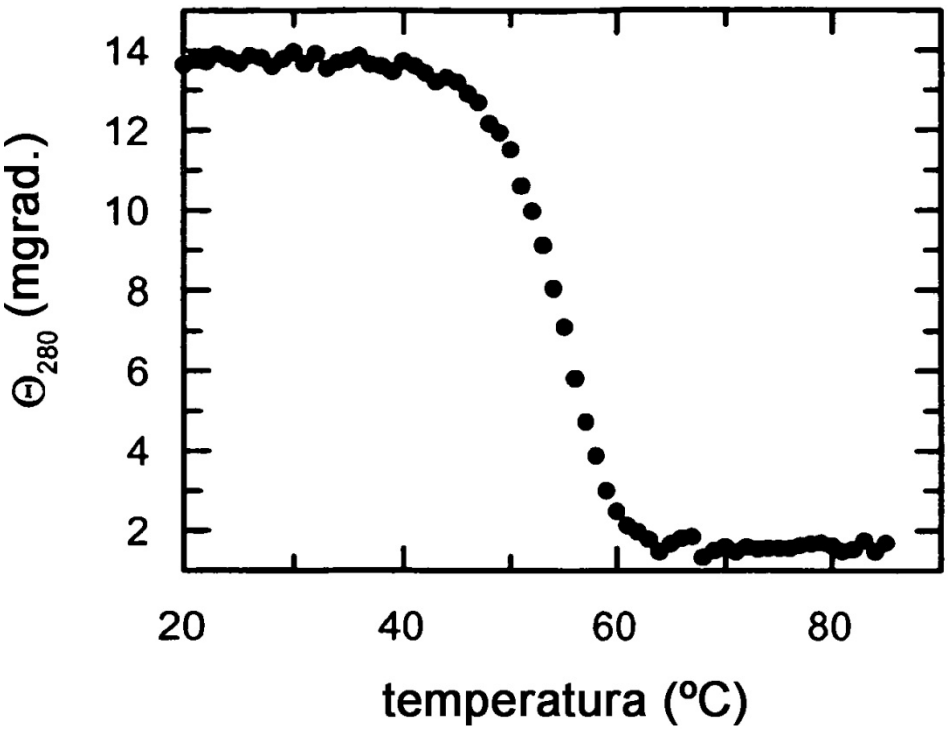


Figura 7/9

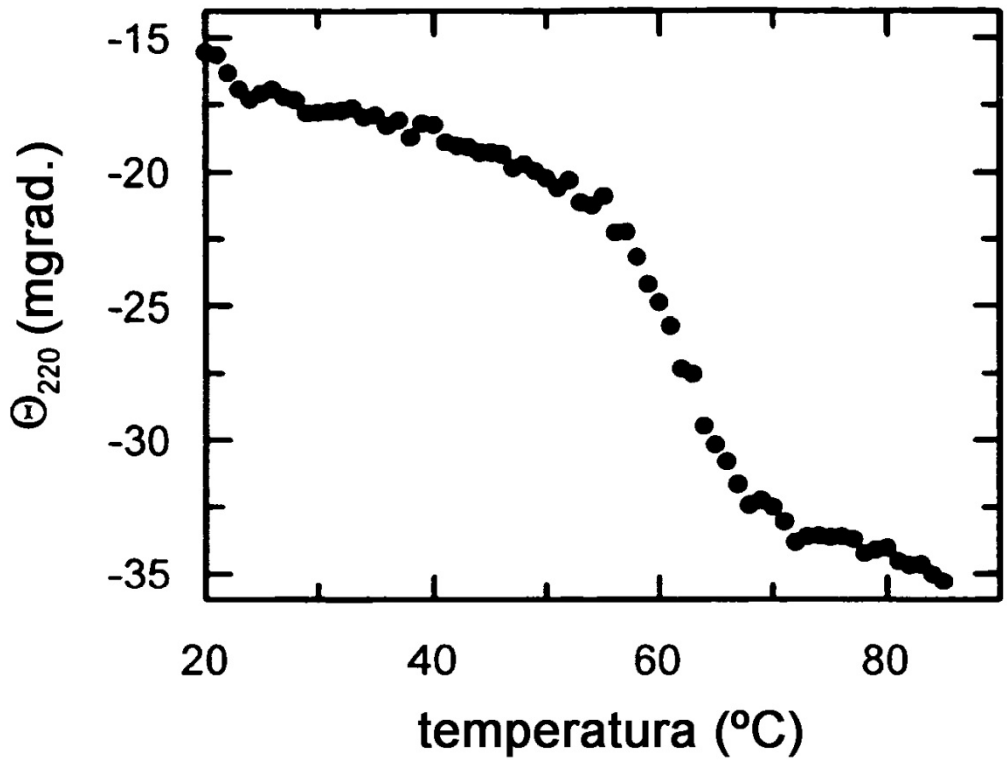


Figura 8/9

	SlpA-gG1(26-189)	SlpA-gG1(26-189)	Recuperación de señal	SlyD-gG1(26-189)	SlyD-gG1(26-189)	Recuperación de señal
	antígeno de referencia	antígeno estrés térmico (60ºC)	tras estrés térmico	antígeno de referencia	antígeno estrés térmico (60ºC)	tras estrés térmico
	señal (pulsos)	señal (pulsos)	(%)	señal (pulsos)	señal (pulsos)	(%)
sueros positivos para anti-VHS-1						
SB neg109	241954	180593	75	152719	100019	66
Trina 1115128	181472	130598	72	119166	74423	62
Trina 4444479	1176920	806119	68	636858	293919	46
trina LQ12733	1139220	917258	81	782170	455511	58
Trina 07/06-531	35549	34581	97	24915	22257	89
Trina1115128	183623	129815	71	122962	56036	46
IBS-4414	709157	531756	75	508355	256149	50
IBS-4528	199456	144827	73	135291	70244	52
IBS-4451	110236	76853	70	71378	34602	48
IBS-4450	312373	235076	75	219408	123093	56
IBS-4532	392030	292690	75	286622	155743	54
IBS-4531	409398	287665	70	294428	141952	48
IBS-4530	713555	521780	73	469525	290578	62
SB109	247457	189436	77	158065	96283	61
sueros negativos para anti-VHS-1			incremento de la señal de fondo tras estrés térmico (%)			incremento de la señal de fondo tras estrés térmico (%)
Trina 07/06-512	606	680	12	1146	2619	128
Trina 07/06-514	608	685	13	1340	4783	257
Trina 07/06-518	604	697	15	1426	4014	181
Trina 07/06-524	642	714	11	1403	5995	327
Trina 07/06-526	636	732	15	1432	6050	322
Trina 07/06-533	669	990	48	1429	13566	849
Trina 07/06-537	631	707	12	1402	3323	137
Trina 07/06-542	623	719	15	1448	2899	100
705 2197	644	749	16	1428	7027	392
IBS-4452	629	742	18	1421	4598	224
IBS-1092	657	731	11	1422	7227	408

Tabla 1

Figura 9/9

ES 2 590 340 T3