

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 891**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/571 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2014 E 14177199 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2827147**

54 Título: **Variantes de la lipoproteína 15 (Lp15) de Vibrio cholerae como aditivo anti-interferencia en inmunoensayos basados en TpN17 para la detección de anticuerpos anti-Treponema**

30 Prioridad:

18.07.2013 EP 13003633

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

12.07.2017

73 Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, DE y
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 623 891 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes de la lipoproteína 15 (Lp15) de *Vibrio cholerae* como aditivo anti-interferencia en inmunoensayos basados en TpN17 para la detección de anticuerpos anti-*Treponema*

Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para detectar anticuerpos contra el antígeno TpN17 de *Treponema pallidum* en una muestra aislada en el que se usa una secuencia peptídica de la lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae* (VcLp15) como reactivo para reducir interferencias y para minimizar los resultados falsos positivos. Además, la invención se refiere a polipéptidos de fusión que comprenden una secuencia peptídica de VcLp15 y una chaperona, a su uso como aditivo en un inmunoensayo para reducir interferencias y para minimizar los resultados falsos positivos y a un kit de reactivos para detectar anticuerpos contra antígenos de *Treponema pallidum* en una muestra aislada que comprende un antígeno TpN17 y dicho polipéptido de fusión de VcLp15-chaperona.

Antecedentes de la invención

La sífilis, también llamada lúes, es una enfermedad infecciosa grave que está causada por *Treponema pallidum*, que pertenece a la familia bacteriana de espiroquetas. Se transmite principalmente por contacto sexual, pero también se puede transmitir de una mujer embarazada al nonato durante el embarazo. La enfermedad se caracteriza por distintas fases clínicas y largos periodos de infección latente, asintomática. Muchos individuos infectados no notan los síntomas y, por tanto, no son conscientes de su infección por sífilis durante años. La infección primaria es localizada y habitualmente provoca una pequeña úlcera indolora (fase primaria, "lúes I"). Si no se trata con penicilina, la enfermedad pasa a la segunda fase lúes II (aproximadamente ocho semanas después de la infección), lo que conlleva síntomas similares a los de la gripe, erupciones cutáneas no pruriginosas e inflamación de los ganglios linfáticos. Después de algunos años, en la fase lúes III, aparecen ganglios sífilíticos por todo el cuerpo. La fase final (lúes IV) se caracteriza por destrucción del sistema nervioso central lo que, finalmente, da lugar a trastornos neurológicos y cardíacos, parálisis general, ataxia, demencia y ceguera.

Aunque se dispone de tratamientos eficaces desde la introducción de la penicilina a mediados del siglo XX, la sífilis sigue siendo un importante problema de salud mundial con 12 millones de nuevas infecciones estimadas en todo el mundo cada año. Es imprescindible identificar de forma fiable a los pacientes con infección por *Treponema* para iniciar el tratamiento con antibióticos y así prevenir la propagación de la sífilis.

Por ello, es necesario proporcionar herramientas de diagnóstico fiables tales como inmunoensayos para la detección de anticuerpos contra *Treponema pallidum*. Sin embargo, para poder utilizar las proteínas derivadas recombinantes como compuestos específicos en aplicaciones serológicas, tienen que cumplir varios requisitos tales como solubilidad, estabilidad y antigenicidad.

La TpN17 (*Treponema pallidum* cepa Nichols, 17 kDa), una pequeña proteína que consta de 134 restos de aminoácido en su forma madura, es el antígeno inmunodominante de *Treponema pallidum*, el agente causante de la sífilis (J. Clin. Lab. Immunol. (1998), 50, 27-44; Folia Microbial. (2003) 48 (4), 549-553). Los anticuerpos contra TpN17 son frecuentes y abundantes en los individuos infectados con *Treponema*, y es imprescindible usar TpN17 en un inmunoensayo que pretenda detectar de forma sensible y fiable las infecciones por *Treponema*.

El documento DE10207135A1 describe un inmunoensayo que usa TpN17 recombinante entre otros antígenos recombinantes de *Treponema pallidum* como antígeno para detectar anticuerpos contra *Treponema pallidum*. Los antígenos recombinantes se expresan en células huésped de *E. coli*. Después de la expresión de los antígenos, las células huésped se centrifugan, se resuspenden y se lisan. Un pequeño volumen de este lisado de *E. coli* se extiende a continuación sobre un portaobjetos de vidrio y se seca. El portaobjetos de vidrio sirve como sustrato en fase sólida para un inmunoensayo para detectar anticuerpos contra los antígenos TpN depositados.

Sin embargo, los autores de la presente invención observaron que un inmunoensayo usando TpN17 como antígeno tiende a mostrar resultados falsos positivos, es decir, proporciona una señal aparentemente positiva aunque, de hecho, no hay anticuerpos contra *Treponema* presentes en esa muestra. Estas interferencias son un fenómeno raro pero significativo. Comprometen la especificidad del inmunoensayo y se deben claramente al uso del antígeno TpN17 de *Treponema pallidum*, que es casi indispensable en un inmunoensayo de sífilis.

Por lo tanto, el problema subyacente de la presente invención se puede solucionar al proporcionar medios y procedimientos para evitar los resultados falsos positivos y aumentar la especificidad de los inmunoensayos basados en TpN17 para la detección de anticuerpos anti-*Treponema*.

Sumario de la invención

La presente invención, tal como se caracteriza en las reivindicaciones, resuelve el problema. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para detectar anticuerpos contra el antígeno TpN17 de *Treponema pallidum*

5 en una muestra aislada en el que se usa una secuencia peptídica de la lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae* (VcLp15) o una secuencia parcial de la misma como reactivo para reducir las interferencias, es decir, para minimizar los resultados falsos positivos. Dicha secuencia parcial de la secuencia del polipéptido VcLp15 puede comprender los aminoácidos 26-163 de la SEQ ID NO. 1. En un modo de realización adicional, dicha secuencia peptídica de VcLp15 o secuencia parcial de la misma se fusiona con una chaperona.

10 La invención también se refiere a un polipéptido de fusión que comprende una secuencia peptídica de VcLp15 de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 o una secuencia parcial de la misma y una chaperona. En un modo de realización preferente, la chaperona fusionada a la secuencia peptídica de VcLp15 se selecciona del grupo que consiste en SlyD, SlpA, FkpA y Skp.

En otro modo de realización preferente, el polipéptido de fusión comprende la SEQ ID NO. 3 que es un polipéptido de fusión de SlyD de *E. coli* y VcLp15 (EcSlyD-VcLp15).

15 La presente invención también abarca el uso de un polipéptido de fusión que comprende un péptido VcLp15 y opcionalmente una chaperona como aditivo en un inmunoensayo para reducir las interferencias y para minimizar los resultados falsos positivos.

20 En otro modo de realización, la invención se refiere a un kit de reactivos para la detección de anticuerpos contra antígenos de *Treponema pallidum* en una muestra aislada mediante un inmunoensayo, que comprende un antígeno TpN17 y un polipéptido de fusión que comprende un péptido VcLp15 y opcionalmente una chaperona.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para detectar anticuerpos contra el antígeno TpN17 de *Treponema pallidum* en una muestra aislada, comprendiendo dicho procedimiento

25 a) formar una mezcla de inmunorreacción mezclando una muestra de fluido corporal con un ligando de unión específica al que se pueden unir específicamente dichos anticuerpos presentes en dicha muestra

30 b) añadir un polipéptido de fusión que comprende un péptido VcLp15 y opcionalmente una chaperona a dicha mezcla de inmunorreacción antes, al mismo tiempo o después de que se añada dicho ligando de unión específica a dicha muestra

35 c) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos presentes en dicha muestra de fluido corporal inmunorreacten con dicho ligando de unión específica para formar un producto de inmunorreacción; y

d) detectar la presencia y/o la concentración de cualquier cantidad de dicho producto de inmunorreacción.

40 Breve descripción de las figuras, tablas y SEQ ID NO.

La figura 1 muestra los espectros de CD en el UV cercano (espectros de diroísmo circular en las regiones del ultravioleta) del polipéptido de fusión EcSlyD-VcLp15 de acuerdo con la invención; para más detalles, remítase el ejemplo 4 que describe la desnaturalización térmica de EcSlyD-VcLp15 por espectroscopia CD.

45 La figura 2 muestra las curvas de fusión del polipéptido de fusión EcSlyD-VcLp15 de acuerdo con la invención, por espectroscopia CD en la región del UV cercano. Para más detalles, ver el ejemplo 4.

La tabla 1 muestra los parámetros de las proteínas de las variantes de los polipéptidos de fusión usadas en este estudio (ejemplo 2).

50 Las tablas 2 a 5 muestran los resultados de los experimentos realizados de acuerdo con el ejemplo 5 sobre la actividad anti-interferencia de Lp15 de *Vibrio cholerae* en un inmunoensayo de sífilis.

55 La tabla 2 muestra los resultados para TpN17 oligomérico como antígeno específico de *Treponema* al que se añade VcLp15 monomérica (fusionada con SlyD como chaperona) para reducir las interferencias.

La tabla 3 muestra los resultados para TpN17 monomérico como antígeno específico de *Treponema* al que se añade VcLp15 monomérica (fusionada con SlyD como chaperona) para reducir las interferencias.

60 La tabla 4 muestra los resultados para TpN17 oligomérico como antígeno específico de *Treponema* al que se añade VcLp15 oligomérica (fusionada con Skp como chaperona) para reducir las interferencias.

La tabla 5 muestra los resultados para TpN17 monomérico como antígeno específico de *Treponema* al que se añade VcLp15 oligomérica (fusionada con Skp como chaperona) para reducir las interferencias.

65

La SEQ ID NO. 1 muestra la secuencia completa de aminoácidos (163 restos) de la lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae* (Vc Lp15) recuperada de la base de datos pública UniProt, n.º de acceso Q9KQN6. Los restos de aminoácido 1-25 constituyen la secuencia señal; la VcLp15 madura comprende los restos de aminoácido 26-163 (subrayados).

5
MMKKSIFALS ALTLILVGCD NQQDAKVEVE KVVVDVAAAPA EQSAAQPSTA SVDAAHNAQN SLDWAGIYQG
TLPCADCGGI ETELTLNADG TYALTEKYLD KEGEPFASQG TFWWNEAGNI VTLQTGDQGTG RQFMVGENTL
SHLDMEGKVI EGELAEFYVL SKQ

La SEQ ID NO. 2 muestra la secuencia de VcLp15 (26-163) como se usa en la fusión con diferentes módulos de chaperona. La secuencia de la VcLp15 madura (restos de aminoácido 26-163) carece de la secuencia de señal N-terminal (restos de aminoácido 1-25) y está desprovista de restos de cisteína. Los dos restos originales de cisteína de VcLp15 de las posiciones 74 y 77 [numeración de la proteína precursora] se remplazaron por restos de alanina – subrayados - para facilitar el procedimiento de replegamiento y para suprimir la formación de aductos de disulfuro. La VcLp15 alberga una cola de hexa-histidina en el extremo C-terminal (subrayada) para facilitar la purificación y para posibilitar el replegamiento acoplado a la matriz a través de una columna de metal (Ni, Zn, Cu).

10
 15
KVEVEKVVVDV AAPAEQSAA QPSTASVDAA HNAQNSLDWA GIYQGTLPAA DAGGIETELT LNADGTYALT
EKYLDKEGEP FASQGTFWWN EAGNIVTLQT GDQTGRQFMV GENTLSHLDM EGKVI EGELA EFYVLSKQLE
HHHHHH

La SEQ ID NO. 3 muestra *EcSlyD-VcLp15* que es un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención, que comprende una molécula de SlyD de *E. coli* como chaperona y la secuencia de VcLp15 madura (26-163, subrayada).

20
 25
MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDSPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRF LAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
SGGGSGGGKV EVEKVVVDVAA APAEQSAAQP STASVDAAHN AQNSLDWAGI YQGTLPAAADA
GGIETELTLN ADGTYALTEK YLDKEGEPFA SQGTFWWNEA GNIVTLQTGD QTGRQFMVGE
NLTLSHLDMEG KVIEGELAEF YVLSKQLEHH HHHH

La SEQ ID NO. 4 muestra *EcSkp-VcLp15* que es un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención, que comprende una molécula de Skp de *E. coli* como chaperona y la secuencia de VcLp15 madura (26-163, subrayada).

30
 35
 40
MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNTLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
RTKLEKDVMA QRQTFAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
NAVAYNSSDV KDITADVLKQ VKGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGKVEVE KVVVDVAAAPA
EQSAAQPSTA SVDAAHNAQN SLDWAGIYQG TLPAAADAGGI ETELTLNADG TYALTEKYLD
KEGEPFASQG TFWWNEAGNI VTLQTGDQGTG RQFMVGENTL SHLDMEGKVI EGELAEFYVL
SKQLEHHHHH H

La SEQ ID NO. 5 muestra la secuencia completa de TpN17 (restos de aminoácido 1-156) de *Treponema pallidum* recuperada de la base de datos pública UniProt, accesible en UniProt ID P29722.

30
 35
 40
MKGSVRLCA FLGVGALGSA LCVSCTTVCP HAGKAKAEKV ECALKGGIFR GTLPAADCPG IDTTVTFNAD
GTAQKVELAL EKKSAPSPLT YRGTMVRED GIVELSLVSS EQSKAPHEKE LYELIDSNSV RYMGPAGAGK
PSKEMAPFYV LKTKK

La SEQ ID NO. 6 muestra la secuencia de TpN17 como se usa en el ejemplo 5. Para este inmunoensayo, se usó la proteína TpN17 madura (restos de aminoácido 23-156) que carecía de la secuencia de señal (restos de aminoácido 1-22). Los autores encontraron que los cuatro restos originales de cisteína de TpN17 eran prescindibles para la antigenicidad de la proteína (no se muestran datos). Por tanto, los restos de cisteína de las posiciones 25, 29, 42 y 58 (numeración de la proteína precursora) se remplazaron por restos de alanina (subrayados) para facilitar el procedimiento de replegamiento y para reducir las reacciones secundarias perjudiciales tales como la formación de aductos de disulfuro.

35
 40
VSATTVAPHA GKAKAEKVEA ALKGGIFRGT LPAADAPGID TTVTFNADGT AQKVELALEK KSAPSPLTYR
GTWMVREDGI VELSLVSSEQ SKAPHEKELY ELIDSNSVRY MGAPGAGKPS KEMAPFYVLK KTKK

La SEQ ID NO. 7 muestra los restos 23-156 de la secuencia de aminoácidos de TpN17 (véase también la SEQ ID NO. 6) como se usa en la fusión con diferentes módulos de chaperona. El TpN17 alberga una cola de hexa-histidina en el extremo C-terminal (subrayada) para facilitar la purificación y para posibilitar el repliegamiento acoplado a la matriz a través de una columna de metal (Ni, Zn, Cu). Se omitió la secuencia de señal N-terminal de TpN17 (restos de aminoácido 1-22) para obtener la forma madura (procesada) de la proteína en su conformación de tipo nativo.

VSATTVAPHA GKAKAEKVEA ALKGGIFRGT LPAADAPGID TTVTFNADGT AQKVELALEK KSAPSPLTYR
GTWMVREDGI VELSLVSSEQ SKAPHEKELY ELIDSNSVRY MGAPGAGKPS KEMAPPYVLK KTKKLEHHHH
HH

La SEQ ID NO. 8 muestra la secuencia de TpN17 (subrayada) a la que se han fusionado dos moléculas de SlyD ("SlyD en tándem") de *E. coli* en el extremo N-terminal; esta molécula también se denomina *EcSlyD-EcSlyD-TpN17* o *EcSS-TpN17*.

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDEG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGFVPEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
SGGGSGGGKV AKDLVVSLEY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
DDHVVDVGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGSGGGG
GGSGGGGSGG GSGGGVSATT VAPHAGKAKA EKVEAALKGG IFRGTLPAAD APGIDTTVTF
NADGTAQKVE LALEKKSAPS PLTYRGTWMV REDGIVELSL VSSEQSKAPH EKELYELIDS
NSVRYMGAPG AGKPSKEMAP FYVLKKTKKL EHHHHHH

La SEQ ID NO. 9 muestra la secuencia de TpN17 (subrayada) a la que se han fusionado dos moléculas de SlyD ("SlyD en tándem") de *Pasteurella multocida* en el extremo N-terminal; esta molécula también se denomina *PmSlyD-PmSlyD-TpN17* o *PmSS-TpN17*.

MKIAKNVVVS IAYQVRTEDEG VLVDEAPVNO PLEYLQGHNN LVIGLENALE GKAVGDKFEV
RVKPEEAYGE YNENMVQRVP KDVPQGVDEL VVGMRFIADT DIGPLPVVIT EVAENDVVVD
GNHMLAGQEL LFSVEVVAIR EATLEBIAHG HIHQEGGGGS GGGSGGGGGS GGGSGGGKIA
KNVVVSIAYQ VRTEDGVLVD EAPVNOPLY LQGHNNLVIG LENALEGKAV GDKFEVRVKP
EEAYGEYNEN MVQRVPKDVQ QGVDELVVGM RFIADTDIGP LPVVITEVAE NDVVVDGNHM
LAGQELLPSV EVVATREATL EEBIAHGHVH EGGGGSGGGG GGGSGGGSGG GSGGGVSATT
VAPHAGKAKA EKVEAALKGG IFRGTLPAAD APGIDTTVTF NADGTAQKVE LALEKKSAPS
PLTYRGTWMV REDGIVELSL VSSEQSKAPH EKELYELIDS NSVRYMGAPG AGKPSKEMAP
FYVLKKTKKL EHHHHHH

La SEQ ID NO. 10 muestra la secuencia de TpN17 (subrayada) a la que se ha fusionado una molécula de FkpA de *E. coli* en el extremo N-terminal; esta molécula también se denomina *EcFkpA-TpN17*.

MAEAAKPATT ADSKAAFKN DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
DAFADKSKLS DQIEIQTQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
GLKNIKKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVVKPAPKA DAKPEADAKA
ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGV SATTVAPHAG KAKAEKVEAA LKGGIFRGTL
PAADAPGIDT TTVTFNADGTA QKVELALEKK SAPSPLTYRG TWMVREDGIV ELSLVSSEQS
KAPHEKELYE LIDSNSVRYM GAPGAGKPSK EMAPPYVLK TTKLEHHHHH H

La SEQ ID NO. 11 muestra la secuencia de TpN17 (subrayada) a la que se ha fusionado una molécula de Skp de *E. coli* en el extremo N-terminal; esta molécula también se denomina *EcSkp-TpN17*.

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNTLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
RTKLEKDVMA QRQTFQAQAQ AFEQDRARRS NEERKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
NAVAYNSSDV KDIADVLKQ VKGGSGGGG GGGSGGGSGG GSGGGVSATT VAPHAGKAKA
EKVEAALKGG IFRGTLPAAD APGIDTTVTF NADGTAQKVE LALEKKSAPS PLTYRGTWMV
REDGIVELSL VSSEQSKAPH EKELYELIDS NSVRYMGAPG AGKPSKEMAP FYVLKKTKKL
EHHHHHH

La SEQ ID NO. 12 muestra la secuencia de aminoácidos del espaciador rico en glicina (que comprende unidades triples de glicina separadas por una serina) que se puede usar como espaciador o conector flexible, soluble y resistente a las proteasas entre varios restos de chaperona.

5 GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGG

Descripción detallada de la invención

10 Los inmunoensayos para la detección de anticuerpos contra *Treponema pallidum* tienden a mostrar resultados falsos positivos como podrían demostrar los autores de la invención. Especialmente, cuando se usa el antígeno TpN17 de *Treponema*, el número de señales falsas positivas es muy elevado. Este fenómeno se ha observado con sueros humanos que se han caracterizado definitivamente como anti-*Treponema* negativos: cuando se usa el antígeno TpN17, se encontró un número significativo de falsos positivos (véase el ejemplo 5). Sin embargo, TpN17 es un inmunógeno crucial en las infecciones por *Treponema* y un antígeno fundamental en la serología de la sífilis. Por eso
15 no es una opción viable eludir este problema de interferencia omitiendo simplemente el antígeno TpN17.

Por lo tanto, los autores comenzaron diseñando una variante de TpN17 recombinante que posibilita la detección fiable y sensible de anticuerpos anti-TpN17. De forma más precisa, fusionamos TpN17 a una chaperona que confiere solubilidad (SlyD en tándem, concretamente *EcSlyD-EcSlyD* y *PmSlyD-PmSlyD*) a través de un conector flexible rico en restos de glicina y serina. Debido a los efectos beneficiosos de los auxiliares de plegamiento fusionados, el polipéptido de fusión resultante cumple todas las exigencias fisicoquímicas e inmunológicas de un buen antígeno con fines serológicos (es decir, para su uso en un inmunoensayo).
20

Las proteínas de fusión chaperona-TpN17 que los autores diseñaron para un inmunoensayo automatizado de sífilis son altamente solubles y reactivas y se usan ventajosamente en un formato de tipo sándwich de doble antígeno. Como se menciona anteriormente, durante los estudios de viabilidad para un inmunoensayo de sífilis, resultó que TpN17 es, de hecho, un antígeno de *Treponema* inmunodominante con una importancia diagnóstica sobresaliente. En otras palabras, es imprescindible usar una variante de TpN17 en un inmunoensayo de sífilis para garantizar la sensibilidad deseada. Sin embargo, cuando se usaron construcciones de fusión de polipéptidos de chaperona y TpN17 en el formato de tipo sándwich de doble antígeno (DAGS), el problema se hizo evidente: a pesar de que las construcciones de fusión de TpN17 se habían diseñado de manera asimétrica (es decir, la simetría del formato DAGS se evitó deliberadamente usando diferentes ligandos de fusión en el lado de la biotina y el lado del rutenio) y a pesar del uso de polímeros de chaperona como aditivos anti-interferencia, se produjo un buen número de resultados positivos en un panel de sueros humanos bien caracterizados anti-*Treponema* negativos, dando lugar a un empeoramiento sustancial de la especificidad del ensayo. Obviamente, algunos de los sueros humanos anti-*Treponema* negativos contenían al menos un factor desconocido que era capaz de interactuar específicamente con el antígeno TpN17.
25
30
35

Para la sorpresa de los autores, resultó que la adición de la proteína Lp15 derivada recombinante del patógeno humano *Vibrio cholerae* (VcLp15) – que, a pesar de ciertas homologías de secuencia, es un organismo muy diferente al *Treponema pallidum* a la mezcla de inmunoensayo redujo las señales elevadas de los falsos positivos al nivel de señal de sueros negativos como puede verse en el ejemplo 5 y en las tablas 2-5. Se concluye que VcLp15 (cuando se añade sin marcar) es capaz de reconocer, unirse e inactivar el factor o factores de interferencia desconocidos que interactúan con TpN17. De hecho, ha resultado que VcLp15 es una herramienta inestimable para reducir los resultados falsos positivos y para mejorar la especificidad de los inmunoensayos de sífilis basados en el antígeno TpN17 de *Treponema*.
40
45

Concretamente, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar anticuerpos contra el antígeno TpN17 de *Treponema pallidum* en una muestra aislada, en el que se usa una secuencia peptídica de la lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae* (VcLp15) o una secuencia parcial de la misma como reactivo para reducir las interferencias y para minimizar los resultados falsos positivos.
50

Se puede usar cualquier antígeno TpN17 o variante del mismo con la condición de que la conformación del antígeno sea suficientemente similar a la nativa como para ser reconocida por los anticuerpos presentes en la muestra. En su huésped natural, *T. pallidum*, la secuencia de señal N-terminal de TpN17 (restos 1-22) se escinde de la proteína precursora para permitir el plegamiento de la parte de TpN17 madura en su conformación nativa. En otras palabras, la secuencia de señal es prescindible cuando TpN17 se produce de forma recombinante en un huésped procarionta tal como *E. coli*. Más bien impide el plegamiento apropiado de la molécula diana y, por tanto, se omite. Preferentemente, se usa una secuencia peptídica de acuerdo con UniProt ID P29722 (SEQ ID NO. 5) o la SEQ ID NO. 6 o una secuencia parcial de las SEQ ID NO. 5 o 6. La secuencia parcial comprende al menos aproximadamente 100 aminoácidos de las SEQ ID NO. 5 o 6. La más preferente es una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácido 23-156 de la SEQ ID NO. 5 o los restos de aminoácido 1-134 de la SEQ ID NO. 6.
55
60

Un antígeno TpN17 preferente es un polipéptido de acuerdo con las SEQ ID NO. 7 a 11 en el que TpN17 se ha fusionado a diversas secuencias peptídicas de chaperona. Para facilitar el procedimiento de replegamiento después de la purificación y para inhibir la formación de aductos de disulfuro, los restos de cisteína de todos los anticuerpos anti-TpN17 previstos se pueden remplazar por otros restos de aminoácido, tales como alanina o serina. Estos restos
5
remplazan el resto tiol sensible a la oxidación de la cadena lateral de cisteína, pero son casi del mismo tamaño que el resto de cisteína. Por lo tanto, habitualmente encajan en la estructura tridimensional global de la proteína y no comprometen seriamente el plegamiento ni la estabilidad de la variante de la proteína libre de cisteína.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se usa una secuencia peptídica de la lipoproteína 15 de
10
Vibrio cholerae (VcLp15) o una secuencia parcial de la misma como reactivo para reducir las interferencias, es decir, para minimizar los resultados falsos positivos. Preferentemente, dicha secuencia parcial de VcLp15 comprende los restos de aminoácido 26-163 de las SEQ ID NO. 1 o 2. La secuencia de señal N-terminal que comprende los restos 1-25 de la SEQ ID NO. 1 es prescindible. En otro modo de la invención se pueden truncar de 1 a 5 aminoácidos del
15
extremo N-terminal o C-terminal o de ambos extremos de dicha secuencia parcial de VcLp15 de los restos de aminoácido 26-163 de las SEQ ID NO. 1 o 2. En otro modo de realización, dicha secuencia parcial de VcLp15 de los restos de aminoácido 26-163 de las SEQ ID NO. 1 o 2 se puede modificar de tal manera que se pueden introducir sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, se puede sustituir un resto de alanina por un resto de serina o cisteína. Cualquiera de estos tres aminoácidos se puede remplazar por los otros dos aminoácidos. Otros ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos conocidas por un experto en la técnica son serina/cisteína/alanina,
20
isoleucina/valina o fenilalanina/tirosina. Para cualquiera de estas modificaciones es importante que la estructura tridimensional de la lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae* (VcLp15) no sufra cambios.

Preferentemente, la secuencia peptídica de VcLp15 o la secuencia parcial de la misma usada en el procedimiento descrito anteriormente se fusiona a una chaperona para proporcionar altos rendimientos de expresión y para facilitar el procedimiento de replegamiento después de la purificación.
25

Otro aspecto de la invención es un polipéptido de fusión que comprende una secuencia peptídica de VcLp15 de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 o 2 o una secuencia parcial de las SEQ ID NO. 1 o 2 y una chaperona.

El uso de proteínas de fusión con polipéptidos en las que las chaperonas se fusionan a secuencias de antígenos diana difíciles para solubilizarlas y hacerlas más inocuas es bien conocido en la técnica y se ha descrito con gran detalle anteriormente, tal como en la solicitud de patente internacional WO 2003/000878. Los ejemplos conocidos y bien documentados de chaperonas de fusión útiles son SlyD, FkpA, Skp y SlpA, véase también la solicitud de patente europea EP2127678A1.
30
35

Por lo tanto, otro aspecto de la invención es un polipéptido de fusión que comprende una secuencia peptídica de VcLp15 y una chaperona. En un modo de realización preferente, la chaperona se selecciona del grupo que consiste en SlyD, SlpA, FkpA y Skp. Estas chaperonas pueden proceder de diversos organismos, preferentemente las secuencias de chaperona se derivan de *E. coli*.
40

En otro modo de realización de la invención, el polipéptido de fusión que comprende una secuencia peptídica de VcLp15 comprende la SEQ ID NO. 3 (*EcSlyD-VcLp15*).
45

El uso de un polipéptido de fusión que comprende una secuencia peptídica de VcLp15 y una chaperona como aditivo en un inmunoensayo para reducir interferencias y para minimizar los resultados falsos positivos es también un aspecto de la presente invención.
50

Otro aspecto de la invención es un kit de reactivos para la detección de anticuerpos contra antígenos de *Treponema pallidum* en una muestra aislada mediante un inmunoensayo, que comprende un antígeno TpN17 y un polipéptido de fusión que comprende una secuencia peptídica de VcLp15 y una chaperona como se describe con más detalle anteriormente.
55

Además, la invención cubre un procedimiento para detectar anticuerpos contra el antígeno TpN17 de *Treponema pallidum* en una muestra aislada, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de
60

a) formar una mezcla de inmunorreacción mezclando una muestra de fluido corporal con un ligando de unión específica al que se puede unir específicamente dichos anticuerpos presentes en dicha muestra

b) añadir un polipéptido de fusión que comprende una secuencia peptídica de VcLp15 como se define anteriormente a dicha mezcla de inmunorreacción antes, al mismo tiempo o después de añadir dicho ligando de unión específica a dicha muestra
65

c) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos presentes en dicha muestra de fluido corporal inmunorreacten con dicho ligando de unión específica para formar un producto de inmunorreacción; y

d) detectar la presencia y/o la concentración de cualquier cantidad de dicho producto de inmunorreacción.

El polipéptido de fusión de la invención se puede añadir a la mezcla de inmunoensayo (que comprende la muestra y un ligando de unión que se une específicamente a los anticuerpos analito de la muestra) antes, al mismo tiempo o después de añadir dicho ligando de unión específica a la muestra. Preferentemente, el polipéptido de fusión se añade a los reactivos de prueba antes de que la muestra de fluido corporal, que contiene los anticuerpos analito, se ponga en contacto con los ligandos de unión específica.

En un modo de realización de la invención, el inmunoensayo para detectar anticuerpos anti-*Treponema* en una muestra aislada se realiza de acuerdo con el denominado concepto de tipo sándwich de doble antígeno (DAGS). A veces, este concepto de ensayo también se denomina concepto de puente de doble antígeno, porque los dos antígenos son unidos en puente por un analito de anticuerpo. En dicho ensayo, se requiere y se usa la capacidad de un anticuerpo de unirse a al menos dos moléculas diferentes de un antígeno dado con sus dos (IgG, IgE), cuatro (IgA) o diez/doce (IgM) parátomos.

En mayor detalle, se lleva a cabo un inmunoensayo para determinar la presencia de anticuerpos anti-*Treponema* de acuerdo con el formato de puente de doble antígeno incubando una muestra que contiene los anticuerpos anti-*Treponema* con dos antígenos TpN17 diferentes, es decir, un primer antígeno TpN17 ("fase sólida") y un segundo antígeno TpN17 ("detección"), en el que cada uno de dichos antígenos se une específicamente a dichos anticuerpos anti-*Treponema*. El primer antígeno está unido o se puede unir directa o indirectamente a una fase sólida y habitualmente porta un grupo efector que es parte de un par de unión con bioafinidad como biotina/avidina. Por ejemplo, si el primer antígeno se conjuga con biotina, la fase sólida se recubre con avidina o estreptavidina. El segundo antígeno porta un marcador detectable. Entonces se forma una mezcla de inmunorreacción que comprende el primer antígeno, el anticuerpo de la muestra y el segundo antígeno. Una fase sólida a la que se puede unir el primer antígeno se añade antes de agregar la muestra a dichos antígenos o después de que se forme la mezcla de inmunorreacción. Esta mezcla de inmunorreacción se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos anti-*Treponema* contra dichos antígenos TpN17 de la muestra de fluido corporal inmunorreaccionen con dichos antígenos TpN17 para formar un producto de inmunorreacción. La siguiente etapa es una etapa de separación en la que la fase líquida se separa de la fase sólida. Finalmente, la presencia de cualquiera de dichos productos de inmunorreacción se detecta en la fase sólida o líquida o en ambas.

En dicho inmunoensayo de DAGS, las estructuras básicas del "antígeno de la fase sólida" y el "antígeno de detección" son las mismas. También es posible usar antígenos TpN17 similares pero diferentes, que formen una reacción cruzada inmunológica en un ensayo de puente de doble antígeno. El requisito esencial para realizar dichos ensayos es que el epítipo relevante o los epítipos relevantes estén presentes en ambos antígenos. De acuerdo con la invención, es deseable usar diferentes restos de fusión para cada antígeno TpN17 (por ejemplo, *Ec* FkpA se fusiona a TpN17 en el lado de la fase sólida y *Ec*Skp se fusiona a TpN17 en el lado de detección) ya que dichas variaciones rompen la simetría del formato DAGS y, por tanto, reducen el problema de formación de puentes mediada por anticuerpos de las chaperonas de fusión que daría lugar a un resultado falso positivo del inmunoensayo. En resumen, el uso de ligandos de fusión estructuralmente lejanos en ambos lados de un formato DAGS reduce las reacciones cruzadas inmunológicas no deseadas y mejora, por tanto, la especificidad.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para detectar anticuerpos contra el antígeno TpN17 de *Treponema pallidum* en una muestra aislada en el que se usa una secuencia peptídica de VcLp15 como reactivo para reducir las interferencias y para minimizar los resultados falsos positivos. Dicho procedimiento se caracteriza, además, porque el ensayo se lleva a cabo en el formato de tipo sándwich de doble antígeno (DAGS). Además, dicho ensayo usa dos polipéptidos de fusión del antígeno TpN17 - un primer y un segundo antígeno TpN17 - en el que ambos antígenos TpN17 son idénticos o al menos forman una reacción cruzada inmunológica con los mismos anticuerpos de modo que es posible la formación de puentes entre ambos antígenos por los anticuerpos presentes en la muestra. Además, el primer y el segundo antígenos se fusionan a diferentes chaperonas como se describe en el párrafo precedente.

Además, el uso de ligandos de fusión de chaperonas específicos como Skp y FkpA puede facilitar un reconocimiento y detección considerablemente mejorados por parte de las IgM. Debido a la avidez de su modo de unión, las moléculas de IgM pueden reaccionar únicamente con antígenos poliméricos que poseen una densidad de epítipos media o alta. Tanto Skp como FkpA son chaperonas oligoméricas que cumplen una función como auxiliares de plegamiento en el periplasma de las bacterias Gramnegativas. Para sorpresa de los autores de la presente invención, se observó que la estructura cuaternaria de Skp y FkpA se mantenía cuando se fusionan moléculas diana grandes con los extremos C-terminales de las chaperonas. Como consecuencia, las proteínas de fusión FkpA-TpN17 y Skp-TpN17 forman de forma reproducible oligómeros naturales con densidades de epítipos definidas que son suficientes para detectar moléculas de IgM. La detección sensible y específica de las IgM es una característica muy importante que garantiza una detección fiable de infecciones precoces y primarias de sífilis. Como se pretende desarrollar un inmunoensayo para la detección de las inmunoglobulinas totales (es decir, la detección tanto de IgG como de IgM), los módulos antígenicos oligoméricos FkpA-TpN17 y Skp-TpN17 se pueden usar de forma ventajosa como determinantes en ambos lados de un formato DAGS (por ejemplo, FkpA-TpN17-biotina y Skp-TpN17-rutenio). Como FkpA y Skp son muy distintos entre sí en términos de estructura, el riesgo de reacción cruzada inmunológica

no deseada y de formación de puentes a través de los ligandos de fusión es muy bajo. Se reduce aún más añadiendo al ensayo los aditivos anti-interferencia FkpA y Skp polimerizados químicamente.

5 Se han descrito ampliamente diversos formatos y principios adicionales de inmunoensayos para detectar analitos y diferentes modos de detección y son conocidos para un experto en la técnica.

De acuerdo con la invención, se puede usar cualquier muestra biológica aislada en la que puedan detectarse anticuerpos anti-*Treponema*. En particular, la sangre humana, el suero, el plasma o la saliva son adecuados como material de muestra.

10 La invención se ilustra adicionalmente en la sección de ejemplos.

Ejemplo 1

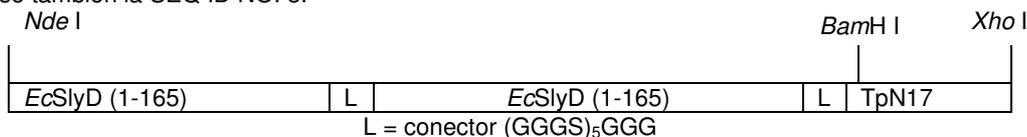
15 Clonación y purificación de polipéptidos de fusión con chaperonas de TpN17 y VcLp15

Clonación de casetes de expresión

20 Sobre la base del plásmido de expresión pET24a de Novagen (Madison, WI, EE. UU.), se obtuvieron casetes de expresión que codifican proteínas de fusión de TpN17 y VcLp15, esencialmente como se describe (Scholz, C. et al., J. Mol. Biol. (2005) 345, 1229-1241). Las secuencias de los antígenos TpN17 y VcLp15 se recuperaron de la base de datos SwissProt (código de SwissProt: P29722 y Q9KQN6, respectivamente). Un gen sintético que codifica los aa 23-156 de TpN17 maduro (el péptido señal que abarca los restos de aminoácido 1-22 se omitió) con una región conectora rica en glicina fusionada en fase al extremo N-terminal se adquirió de Medigenomix (Martinsried, Alemania). Los restos de cisteína de TpN17 de las posiciones 25, 29, 42 y 58 se cambiaron a restos de alanina para evitar efectos secundarios no deseados tales como la oxidación o la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Los sitios de restricción *Bam*HI y *Xho*I estaban en los extremos 5' y 3' de la región codificante de TpN17, respectivamente. Otro gen sintético que codifica dos unidades *Ec*SlyD (restos 1-165 de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, SwissProt n.º de acceso P0A9K9) conectadas a través de una región conectora rica en glicina y que abarca parte de una región conectora adicional en el extremo C-terminal, también se adquirió de Medigenomix. Los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI estaban en los extremos 5' y 3' de este casete, respectivamente. Los genes y los sitios de restricción se diseñaron para posibilitar la fusión en fase de la parte de la chaperona *Ec*SlyD-*Ec*SlyD y la parte del antígeno TpN17 por ligamiento simple. Para evitar procesos de recombinación accidentales y para aumentar la estabilidad genética del casete de expresión en el huésped de *E. coli*, las secuencias de nucleótidos que codifican las unidades *Ec*SlyD se degeneraron, al igual que las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones conectoras ampliadas, es decir, se usaron diferentes combinaciones de codones para codificar secuencias de aminoácidos idénticas.

40 El vector pET24a se digirió con *Nde*I y *Xho*I y se insertó el casete que comprendía SlyD en tándem fusionado en fase a los aa 23-156 del TpN17 de *Treponema*. De este modo se construyeron casetes de expresión que comprenden SlyD de *Pasteurella multocida* (1-156, código de SwissProt: Q9CKP2) o Skp (21-161, código de SwissProt: P0AEU7) o FkpA de *E. coli* (26-270, código de SwissProt: P45523), así como casetes de expresión que comprenden polipéptidos diana diferentes de TpN17, especialmente la lipoproteína Lp15 de *Vibrio cholerae* (26-163, código de SwissProt: Q9KQN6). Al igual que con TpN17, los restos de cisteína originales de VcLp15 de las posiciones 74 y 77 (numeración de la Lp15 precursora) se cambiaron a restos de alanina para evitar efectos secundarios no deseados tales como la oxidación o la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Todas las variantes del polipéptido de fusión recombinante contenían una cola de hexahistidina C-terminal para facilitar la purificación asistida por Ni-NTA y el repliegamiento. Se utilizó QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) y técnicas estándar de PCR para generar mutaciones puntuales, variantes de delección, de inserción y de extensión o sitios de restricción en los casetes de expresión respectivos.

55 A continuación, el dibujo muestra un esquema del antígeno TpN17 de longitud completa (23-156) de *Treponema* que porta dos unidades de chaperona SlyD fusionadas en fase a su extremo N-terminal. Para indicar que el ligando de fusión SlyD procede de *E. coli*, el polipéptido de fusión representado se ha denominado *Ec*SlyD-*Ec* SlyD-TpN17 (23-156); véase también la SEQ ID NO. 8.



60 El inserto del plásmido resultante se secuenció y se descubrió que codificaba la proteína de fusión deseada. La secuencia completa de aminoácidos de los polipéptidos de la fusión TpN17 y VcLp15 se muestra en las SEQ ID NO. 2 a 4 (VcLp15) y 7 a 11 (TpN17). La secuencia de aminoácidos del conector L se muestra en la SEQ ID NO. 12.

Purificación de proteínas de fusión que comprenden TpN17 o VcLp15

Todas las variantes de la proteína de fusión de TpN17 y VcLp15 se purificaron usando protocolos prácticamente idénticos. Las células de *E. coli* BL21 (DE3) que portaban el plásmido de expresión de pET24a particular se cultivaron a 37 °C en medio LB más kanamicina (30 µg/ml) a una DO₆₀₀ de 1,5 y se indujo la sobreexpresión citosólica añadiendo isopropil-β-D-tiogalactósido 1 mM. Tres horas después de la inducción, las células se recogieron por centrifugación (20 min a 5000 g), se congelaron y se almacenaron a -20 °C. Para la lisis celular, el sedimento congelado se resuspendió en fosfato de sodio 50 mM enfriado a pH 8,0, GdmCl 7,0 M, imidazol 5 mM y la suspensión se agitó durante 2 h sobre hielo para completar la lisis celular. Después de la centrifugación y la filtración (0,45 µm/0,2 µm), el lisado en bruto se aplicó a una columna de Ni-NTA equilibrada con el tampón de lisis que incluía TCEP 5,0 mM. La etapa de lavado posterior se adaptó para la proteína diana respectiva y varió de 5 a 15 mM de imidazol (en fosfato de sodio 50 mM a pH 8,0, GdmCl 7,0 M, TCEP 5,0 mM). Se aplicaron al menos 10-15 volúmenes del tampón de lavado. A continuación, la solución de GdmCl se reemplazó por fosfato de potasio 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, imidazol 10 mM, TCEP 5,0 mM para inducir el replegamiento conformacional de la proteína unida a la matriz. Para evitar la reactivación de las proteasas de copurificación, se incluyó un coctel inhibidor de proteasas (Complete® libre de EDTA, Roche) en el tampón de replegamiento. Se aplicó un total de 15-20 volúmenes de columna de tampón de replegamiento en una reacción durante la noche. A continuación, se eliminaron tanto el TCEP como el cóctel inhibidor Complete® libre de EDTA por lavado con 3-5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, imidazol 10 mM. Posteriormente, la concentración de imidazol – aún en fosfato de potasio 50 mM a pH 8,0, KCl 100 mM – se elevó a 25 - 50 mM (dependiendo de la proteína diana respectiva) para eliminar los contaminantes de proteína unidos de forma no específica. La proteína nativa se eluyó luego con imidazol 500 mM en el mismo tampón. Las fracciones que contenían proteínas se evaluaron para determinar la pureza por Tricina-SDS-PAGE y se combinaron. Finalmente, las proteínas se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex HiLoad, Amersham Pharmacia) y las fracciones que contenían proteínas se combinaron y se concentraron hasta 10-20 mg/ml en una celda de Amicon (YM10).

Después del protocolo de purificación y replegamiento acoplado, se pudieron obtener rendimientos de proteína de aproximadamente 10-30 mg de 1 g de células húmedas de *E. coli*, dependiendo de la proteína diana respectiva.

30 Ejemplo 2Mediciones espectroscópicas

Las mediciones de concentración de proteínas se realizaron con un espectrofotómetro de doble haz Uvikon XL. Los coeficientes de extinción molar (ϵ_{280}) se determinaron usando el procedimiento descrito por Pace (1995), Protein Sci. 4, 2411-2423. Los coeficientes de extinción molar (ϵ_{M280}) usados para los distintos polipéptidos de fusión se especifican en la tabla 1.

40 Tabla 1: Parámetros de las proteínas de las variantes de los polipéptidos de fusión usadas en este estudio. Todos los parámetros se refieren a los monómeros de proteína respectivos.

proteína de fusión	longitud de la proteína diana (restos de aa)	peso molecular del polipéptido de fusión (Da)	pI	ϵ_{M280} M ⁻¹ cm ⁻¹	Abs _{0,1%} (= 1 mg/ml)
variantes de TpN17					
<i>EcSlyD-EcSlyD-TpN17</i>	23-156	54048	5,0	23380	0,433
<i>PmSlyD-PmSlyD-TpN17</i>	23-156	52171	4,9	23380	0,448
<i>EcFkpA-TpN17</i>	23-156	42995	8,3	27390	0,637
<i>EcSkp-TpN17</i>	23-156	32461	9,3	12950	0,399
variantes de VcLp15					
<i>EcSlyD-VcLp15</i>	26-163	35156	4,6	22920	0,652
<i>EcSkp-VcLp15</i>	26-163	33010	5,3	18450	0,559

Las secuencias de aminoácidos de las variantes del polipéptido de fusión se muestran en las SEQ ID NO. 3, 4, 8, 9, 10 y 11, respectivamente.

45 Ejemplo 3Acoplamiento de restos de biotina y rutenio a las proteínas de fusión de TpN17

50 Los grupos ε-amino de las lisinas de los polipéptidos de fusión de TpN17 se modificaron a concentraciones de proteína de 10-30 mg/ml con moléculas marcadoras de biotina y rutenio activadas con N-hidroxisuccinimida,

respectivamente. La proporción de marcador/proteína varió de 2/1 a 5/1 (mol/mol), dependiendo de la proteína de fusión respectiva. El tampón de reacción era fosfato de potasio 150 mM a pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 min y se inactivó añadiendo L-lisina tamponada hasta una concentración final de 10 mM. Para evitar la inactivación hidrolítica de los marcadores, las soluciones madre respectivas se prepararon en DMSO seco (calidad SeccoSolv, Merck, Alemania). Todas las proteínas de fusión estudiadas toleraron bien las concentraciones de DMSO de hasta un 25 % en el tampón de reacción. Después de la reacción de acoplamiento, se eliminó el marcador libre sin reaccionar pasando el conjugado de proteína en bruto por una columna de filtración en gel (Superdex 200 HiLoad).

Ejemplo 4

Desnaturalización de *EcSlyD-VcLp15* inducida térmicamente, detectada por CD

Los espectros por CD en el UV cercano se registraron con un espectropolarímetro Jasco-720 con un portacubetas termorregulado y se convirtieron a la elipticidad media de los restos. El tampón era fosfato de potasio 50 mM a pH 7,0, KCl 250 mM, EDTA 0,5 mM. La longitud de la trayectoria fue de 0,2 cm, la concentración de proteína fue de ~ 74 μ M (2,6 mg/ml). El intervalo de medición fue de 250 - 330 nm, el ancho de banda fue de 1,0 nm, la velocidad de exploración fue de 20 nm/min a una resolución de 0,5 nm y la respuesta fue de 1 s. Para mejorar la proporción de señal a ruido, los espectros se midieron nueve veces y se promediaron.

La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) es el procedimiento de elección para evaluar tanto la estructura secundaria como la terciaria de las proteínas. La elipticidad en la región aromática (260-320 nm) informa sobre los contactos terciarios dentro de una proteína (es decir, la estructura globular de una proteína plegada regularmente) y se considera como la región de huella dactilar de un plegamiento nativo (conformación).

Se controlaron los espectros por CD en el UV cercano de *EcSlyD-VcLp15* para abordar la cuestión de si la proteína de fusión adopta una conformación ordenada después del procedimiento de replegamiento acoplado a la matriz que es la etapa crucial en el procedimiento de purificación. La respuesta es bastante clara: la señal por CD en el UV cercano de *EcSlyD-VcLp15* informa inequívocamente de una estructura terciaria ordenada del polipéptido de fusión. Los restos aromáticos de *EcSlyD-VcLp15* están obviamente incrustados en el núcleo de proteína lipófila y, por tanto, experimentan un entorno asimétrico que apunta claramente a una conformación nativa de *Ec SlyD-VcLp15* dentro de la construcción de fusión (figura 1).

Para abordar la cuestión de si la desnaturalización inducida térmicamente de *EcSlyD-VcLp15* es reversible, se obtuvieron las curvas de fusión en la región del UV cercano a una longitud de onda de detección de 281 nm. El intervalo de temperatura fue de 20-80 °C, el ancho de banda fue de 1,0 nm, la rampa de temperatura fue de 1 °C/min y la respuesta fue de 4 s (véase la figura 2).

La desnaturalización inducida térmicamente se controló a 281 nm (que es la longitud de onda de la amplitud de señal máxima para *EcSlyD-VcLp15*). Al calentarse, los contactos no covalentes que estabilizan la conformación nativa de la molécula *EcSlyD-VcLp15* se aflojan y finalmente se rompen. Esta desnaturalización inducida térmicamente se refleja en un aumento en la señal de CD como se muestra en la figura 2. A 80 °C, *EcSlyD-VcLp15* se desplegó completamente. Sorprendentemente, la señal de CD nativa se restablece de nuevo cuando la solución de proteína se enfría hasta 20 °C. A pesar de una ligera histéresis, la curva de desnaturalización y la curva de replegamiento prácticamente se superponen, lo que indica claramente un comportamiento de replegamiento reversible de *EcSlyD-VcLp15*. Debe admitirse que la cooperatividad de la desnaturalización es bastante baja y que no se observa la forma sigmoidea típica de una curva de fusión de proteínas en el caso de *EcSlyD-VcLp15*. Sin embargo, los autores descubrieron inequívocamente que *EcSlyD-VcLp15* es capaz de volver a adoptar su conformación nativa cuando la solución de proteína se enfría de 80 °C a 20 °C. De hecho, los espectros de CD en el UV cercano controlados antes y después de la desnaturalización inducida térmicamente, prácticamente se superponen (véase la figura 1). En conclusión, *EcSlyD-VcLp15* posee propiedades de plegamiento robustas que son sobresalientes para un polipéptido de fusión y que son altamente deseadas para una molécula que sirve como aditivo anti-interferencia en un inmunoensayo. Estas propiedades fisicoquímicas inocuas, en combinación con una solubilidad sobresaliente (> 130 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato) y el potencial anti-interferencia en un inmunoensayo anti-*Treponema* hacen de *EcSlyD-VcLp15* una molécula muy atractiva que garantiza una alta especificidad en la serología de la sífilis.

Ejemplo 5:

Actividad anti-interferencia de la Lp15 de *Vibrio cholerae* en un inmunoensayo de sífilis

La actividad anti-interferencia de las variantes de los polipéptidos de fusión de Lp15 de *Vibrio cholerae* se evaluó en un analizador automatizado Elecsys® 2010 (Roche Diagnostics GmbH). Elecsys® es una marca registrada del grupo Roche. Las mediciones se llevaron a cabo en el formato de tipo sándwich de doble antígeno.

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

Los polipéptidos recombinantes de Lp15 anti-interferencia se evaluaron en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich de doble antígeno (DAGS). Para este fin, se usó el antígeno TpN17 recombinante de *Treponema* como un conjugado de biotina y rutenio, respectivamente, para detectar anticuerpos anti-TpN17 en sueros humanos. TpN17 es uno de los antígenos inmunodominantes de *Treponema pallidum* y las variantes solubles de TpN17 – como se divulga en la presente solicitud de patente - son herramientas inestimables para la detección de infecciones de sífilis. Para detectar moléculas de IgG anti-TpN17, se usaron *EcSlyD-EcSlyD-TpN17*-biotina y *PmSlyD-PmSlyD-TpN17*-rutenio en R1 (tampón de reactivo 1) y R2 (tampón de reactivo 2), respectivamente. Para detectar tanto las moléculas de IgM como de IgG anti-TpN17, se usaron *EcFkpA-TpN17*-biotina y *EcSkp-TpN17*-rutenio en R1 (tampón de reactivo 1) y R2 (tampón de reactivo 2), respectivamente. Las concentraciones de los conjugados de antígeno en R1 y R2, respectivamente, fueron de 200 ng/ml cada una.

En un primer experimento, los sueros humanos negativos para *Treponema* se evaluaron con el sistema de inmunoensayo DAGS mencionado anteriormente. Para obtener un indicio a la tasa de incidencia de falsos positivos que están dirigidos únicamente al resto TpN17, se realizó un cribado en presencia de SS-Helix (GDA, P), un polímero SlyD heterogéneo soluble reticulado con GDA que se usa habitualmente como sustancia anti-interferencia. Además, se incluyó *EcSkp-EcSlyD-EcSlyD*, otro módulo anti-interferencia, en el tampón de ensayo para descartar fenómenos de interferencia debidos a restos diferentes de la misma parte TpN17. Se añadieron SS-Helix (GDA, P) y *EcSkp-EcSlyD-EcSlyD* a R1 (tampón de reactivo 1 que contenía el conjugado de biotina) en grandes cantidades en exceso (10 µg/ml). Después se mezclaron 75 µl de R1 (tampón de reactivo 1, conjugado de biotina y polímeros anti-interferencia), 75 µl de R2 (tampón de reactivo 2, conjugado de rutenio), 10 µl de muestra (suero humano) y 40 µl de suspensión de perlas y se incubaron para proporcionar un volumen de reacción de aproximadamente 200 µl.

Mediante esta estrategia, se pudieron encontrar aproximadamente 8 sueros humanos (de ~ 2500 sueros humanos negativos) que eran claramente negativos para los anticuerpos anti-*Treponema pallidum*, pero mostraban señales elevadas en el formato DAGS cuando se usaba TpN17 como antígeno. Sin embargo, las señales de Elecsys® no se incrementaron cuando se usaron otros antígenos de *Treponema* tales como TpN15 o TpN47 en lugar de TpN17 (no se muestran datos). Este hallazgo apunta a un factor de interferencia anti-TpN17 específico.

La tabla 2 ilustra el efecto anti-interferencia de *EcSlyD-VcLp15* monomérica no marcada en un sistema de ensayo con TpN17 oligomérico. Se usaron *EcFkpA-TpN17*-Bi (DDS) y *EcSkp-TpN17*-BPRu (SK(2)DSS) como antígenos de detección oligoméricos y se le añadió *EcSlyD-VcLp15* no marcado a R1 en concentraciones crecientes. Es obvio que las señales de los sueros positivos verdaderos se inactivan significativamente con la adición de Lp15. Sin embargo, las señales positivas siguen siendo claramente positivas, incluso cuando se añade *VcLp15* en altas concentraciones tales como 1 µg/ml a R1. Como era de esperar, los sueros humanos bien caracterizados (Trina Bioreactivos AG, Nänikon, Suiza) para los que se han descartado claramente las infecciones por *Treponema*, muestran señales muy bajas cerca de la señal de fondo inherente al sistema (~ 450 recuentos), independientemente de la adición de *VcLp15*. Los sueros de interferencia tales como C131839, C132663, C132723, R183554 y C132976 muestran señales significativamente elevadas cuando no se añade un módulo anti-interferencia de *VcLp15*. Como la señal promediada de los sueros negativos asciende a ~ 770 recuentos, es evidente que los niveles de señal de 15.146 recuentos (para el suero humano C132663) o 8.503 recuentos (para el suero humano C132723) apuntarían a un resultado positivo verdadero que suscitaría la sospecha de una infección de sífilis. Es extraordinario que la adición de *VcLp15* a una concentración de 1,0 µg/ml en R1 reduce las señales elevadas al nivel normal de la señal de fondo, revelando los resultados supuestamente positivos como falsos positivos. Lo mismo ocurre cuando se añade *EcSlyD-VcLp15* monomérico no marcado en un sistema DAGS de TpN17 monomérico (tab. 3). De nuevo, se reducen los niveles de señal significativamente elevados como con el suero humano C132663 de 11.128 recuentos a 651 recuentos cuando se añade *EcSlyD-VcLp15* a R1 a una concentración de 1,0 µg/ml. Por el contrario, *VcLp15* oligomérica (*EcSkp-VcLp15*) inactiva de forma eficaz las señales elevadas y falsas positivas, respectivamente, al fondo de la señal negativa en el sistema DAGS de TpN17 tanto oligomérico (tab. 4) como monomérico (tab. 5).

TpN17 de *Treponema pallidum* y la lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae* comparten un 34 % de identidad de secuencia y un 55 % de homología en un tramo de 97 restos de aminoácido. Es probable que a través de este motivo de secuencia compartido (y probablemente estructural) tenga lugar la reacción cruzada inmunológica, lo que provoca señales elevadas y, por tanto, simula un resultado positivo en los ensayos de *Treponema* que se basan en el antígeno TpN17. La adición de la proteína anti-interferencia *VcLp15* a la mezcla de ensayo reduce las señales elevadas a los negativos normales, como se muestra en las tablas 2-5. Los datos divulgados proporcionan pruebas convincentes de que incluso interferencias muy fuertes, es decir, altos falsos positivos, se pueden eliminar eficazmente por la adición de la lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae* en forma monomérica u oligomérica. La conclusión de los resultados mostrados en las tablas 2-5 es la siguiente: las interferencias debidas al uso del antígeno TpN17 recombinante en un inmunoensayo DAGS son bastante frecuentes (> 1 de cada 500 sueros

negativos) y se pueden mitigar de manera eficaz por la adición de lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae*, que es un género bacteriano bastante distante filogenéticamente de *Treponema pallidum*. En términos sencillos, la presente solicitud divulga que la adición de una proteína recombinante fácilmente disponible mejora significativamente la especificidad de un inmunoensayo de sífilis basado en TpN17 para la detección de anticuerpos anti-*Treponema*.

5

Tabla 2:

TpN17 oligomérico: adición de VcLp15 monomérica

10 R1 *EcFkpA*-TpN17-Bi(DDS)

R2 *EcSkp*-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)

R1

c (µg/ml)

		EcSlyD-VcLp15					
		0	0,1	0,2	0,3	0,5	1,0
		recuentos	recuentos	recuentos	recuentos	recuentos	recuentos
sueros positivos							
PLTP_124	sin dil.	1.274.726	1.171.468	1.166.110	1.092.657	973.974	793.911
PLTP_124	1:50	154.146	156.165	136.898	131.248	101.395	62.840
PLTP_121	1:50	223.230	211.697	205.298	190.606	151.374	93.737
PLTP_121	1:100	112.031	105.466	103.909	91.727	72.926	47.972
BM 146027	SC_056	1.408.728	1.357.227	1.258.085	1.217.480	1.149.624	1.133.749
BM 146623	SC_058	1.187.013	1.158.037	1.083.204	1.083.952	1.078.868	1.050.374
sueros negativos							
Trina n.º 0642	neg.	778	716	722	698	698	661
Trina n.º 0645	neg.	725	703	722	682	715	706
Trina n.º 0646	neg.	797	795	817	802	784	784
Trina n.º 0647	neg.	774	786	764	773	762	742
sueros de interferencia							
C131839	falso positivo	5.795	5.090	4.464	3.861	2.851	1.555
C132663	falso positivo	15.146	2.116	1.110	878	765	724
C132723	falso positivo	8.503	7.725	6.811	5.357	2.298	941
R183554	falso positivo	11.072	10.030	9.142	7.413	4.488	2.534
C132976	falso positivo	5.687	5.174	4.446	3.690	2.509	1.419

15 Tabla 3:

TpN17 monomérico: adición de VcLp15 monomérica

20 R1 *EcSS*-TpN17-Bi(DDS)

R2 *PmSS*-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)

R1

c (µg/ml)

		EcSlyD-VcLp15					
		0	0,1	0,2	0,3	0,5	1,0
		recuentos	recuentos	recuentos	recuentos	recuentos	recuentos
sueros positivos							

ES 2 623 891 T3

PLTP 124	sin dil.	1.467.523	1.374.990	1.272.604	1.272.720	1.208.354	1.164.404
PLTP 124	1:50	167.294	155.940	153.077	136.428	124.244	89.204
BM 146624	sin dil.	1.451.271	1.423.730	1.376.393	1.359.799	1.370.884	1.369.198
BM 146624	1:10	436.534	403.003	384.434	365.742	329.370	259.984
BM 145855	SC 055	901.047	816.640	766.258	707.030	616.574	511.011
BM 146027	SC 056	1.721.399	1.708.261	1.678.979	1.651.647	1.641.513	1.641.787
sueros negativos							
Trina n.º 0642	neg.	657	613	638	626	623	610
Trina n.º 0643	neg.	698	703	699	704	687	665
Trina n.º 0644	neg.	660	653	638	636	620	616
Trina n.º 0646	neg.	634	617	634	628	621	613
Trina n.º 0647	neg.	623	614	606	620	618	623
sueros de interferencia							
C131839	falso positivo	4.206	3.707	3.364	2.996	2.309	1.383
C132663	falso positivo	11.128	1.812	1.119	895	729	651
R179865	señal elev.	1.630	1.338	1.219	1.114	1.000	873
R183554	señal elev.	1.015	894	883	819	790	740
C132976	falso positivo	4.866	4.041	3.454	2.911	2.057	1.230

Tabla 4:

5 TpN17 oligomérico; adición de VcLp15 oligomérica

R1 *EcFkpA*-TpN17-Bi(DDS)

R2 *EcSkp*-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)

R1

c (µg/ml)

		<i>EcSkp</i>-VcLp15		
		0	0,1	1,0
		recuentos	recuentos	recuentos
sueros positivos				
PLTP_121	1:50	230.387	225.976	104.039
PLTP_121	1:100	116.383	112.747	55.150
BM 140149	SC_052	1.136.096	1.077.292	508.996
BM 200680	SC_054	826.355	737.483	354.883
BM 145855	SC_055	745.762	704.713	322.241
BM 146027	SC_056	1.446.006	1.380.464	1.192.282
sueros negativos				
Trina n.º 0642	neg.	750	757	744
Trina n.º 0646	neg.	840	847	815
Trina n.º 0872	neg.	846	805	750

ES 2 623 891 T3

Trina n.º 0873	neg.	764	763	754
sueros de interferencia				
R179865	falso positivo	3.951	1.580	782
C131839	falso positivo	6.142	4.805	1.587
C132663	falso positivo	16.565	2.510	755
C132723	falso positivo	7.868	4.406	875
R183554	falso positivo	10.511	8.747	1.306
C132976	falso positivo	6.274	3.062	1.088

Tabla 5:

5 TpN17 monomérico: adición de VcLp15 oligomérica

R1 *EcSS*-TpN17-Bi(DDS)

R2 *PmSS*-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)

R1

c (µg/ml)

		<i>EcS</i>kp-VcLp15		
		0	0,1	1,0
		recuentos	recuentos	recuentos
sueros positivos				
PLTP_121	1:50	235.946	221.210	112.238
PLTP_121	1:100	118.333	113.770	60.259
BM 140149	SC_052	1.142.874	1.048.211	637.784
BM 200680	SC_054	757.518	672.745	382.894
BM 145855	SC_055	861.637	823.346	475.266
BM 146027	SC_056	1.550.267	1.553.275	1.516.740
sueros negativos				
Trina n.º 0642	neg.	673	673	632
Trina n.º 0646	neg.	651	659	646
Trina n.º 0872	neg.	680	683	639
Trina n.º 0873	neg.	690	661	651
sueros de interferencia				
C132221	señal elev.	1.301	1.204	950
C131839	falso positivo	3.928	3.108	1.144
C132663	falso positivo	11.457	2.270	671
C132927	señal elev.	1.551	1.284	877
R183554	señal elev.	1.003	858	672
C132976	falso positivo	4.476	2.373	829

REIVINDICACIONES

5

1. Un procedimiento para detectar anticuerpos contra el antígeno TpN17 de *Treponema pallidum* en una muestra aislada, en el que se usa una secuencia peptídica de la lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae* (VcLp15) como reactivo para reducir las interferencias y para minimizar los resultados falsos positivos, en el que dicha secuencia de VcLp15 comprende los restos de aminoácido 26-163 de las SEQ ID NO. 1 o 2 y

10

en el que se pueden truncar de 1 a 5 aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal o de ambos extremos de dicha secuencia de VcLp15 y

15

en el que dicha secuencia de VcLp15 se puede modificar por sustituciones conservadoras de aminoácidos de manera que la estructura tridimensional de la lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae* (VcLp15) no sufra cambios.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia peptídica de VcLp15 se fusiona a una chaperona.

20

3. Polipéptido de fusión que comprende una secuencia peptídica de VcLp15 de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 o 2

en el que dicha secuencia de VcLp15 comprende los restos de aminoácido 26-163 de las SEQ ID NO. 1 o 2 y

25

en el que se pueden truncar de 1 a 5 aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal o de ambos extremos de dicha secuencia de VcLp15 y

en el que dicha secuencia de VcLp15 se puede modificar por sustituciones conservadoras de aminoácidos y una chaperona

30

de modo que la estructura tridimensional de la lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae* (VcLp15) no sufra cambios.

4. Polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha chaperona se selecciona del grupo que consiste en SlyD, SlpA, FkpA y Skp.

35

5. Polipéptido de fusión de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, que comprende la SEQ ID NO. 3.

6. Uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con las reivindicaciones 3 a 5 como aditivo en un inmunoensayo para reducir interferencias y para minimizar los resultados falsos positivos.

40

7. Un kit de reactivos para detectar anticuerpos contra antígenos de *Treponema pallidum* en una muestra aislada mediante un inmunoensayo, que comprende un antígeno TpN17 y un polipéptido de fusión de acuerdo con las reivindicaciones 3 a 5.

45

8. Un procedimiento para detectar anticuerpos contra el antígeno TpN17 de *Treponema pallidum* en una muestra aislada de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento

a) formar una mezcla de inmunorreacción mezclando una muestra de fluido corporal con un antígeno TpN17 como ligando de unión específica al que se pueden unir específicamente dichos anticuerpos presentes en dicha muestra

50

b) añadir un polipéptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 a dicha mezcla de inmunorreacción antes, al mismo tiempo o después de añadir dicho ligando de unión específica a dicha muestra

c) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos presentes en dicha muestra de fluido corporal inmunorreacten con dicho antígeno TpN17 como ligando de unión específica para formar un producto de inmunorreacción; y

55

d) detectar la presencia y/o la concentración de cualquier cantidad de dicho producto de inmunorreacción.

60

9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que se usan dos antígenos TpN17 como ligandos de unión específica para los anticuerpos a detectar en la muestra aislada,

un primer antígeno TpN17 que comprende una secuencia de TpN17 y una primera chaperona, en el que dicho primer antígeno TpN17 puede estar unido a una fase sólida,

65

un segundo antígeno TpN17 que comprende una secuencia de TpN17 y una segunda chaperona, en el que dicho segundo antígeno TpN17 porta un marcador detectable,

5 en el que ambos antígenos TpN17 son idénticos o presentan una reacción cruzada inmunológica de manera que los anticuerpos presentes en la muestra se pueden unir a ellos de forma específica, y

en el que la primera y la segunda chaperona son diferentes.

10 10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el primer antígeno TpN17 comprende FkpA de *E. coli* como chaperona y el segundo antígeno TpN17 comprende Skp de *E. coli* como chaperona.

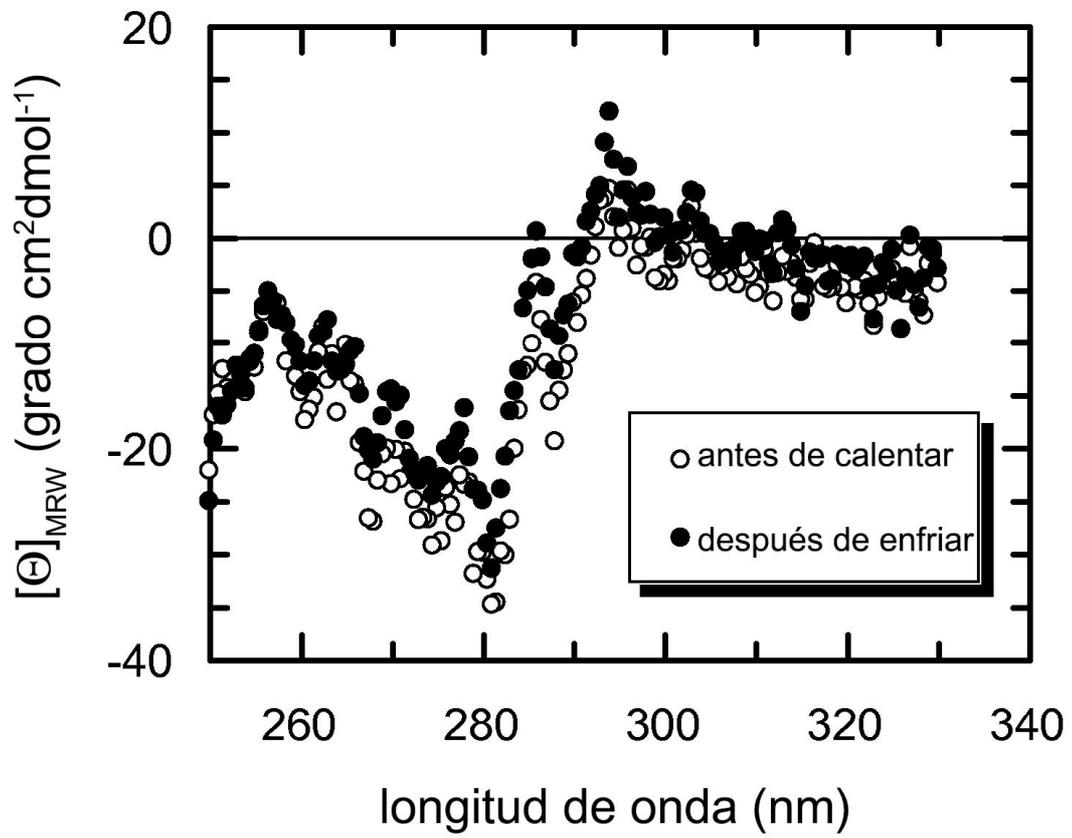


Figura 1/2

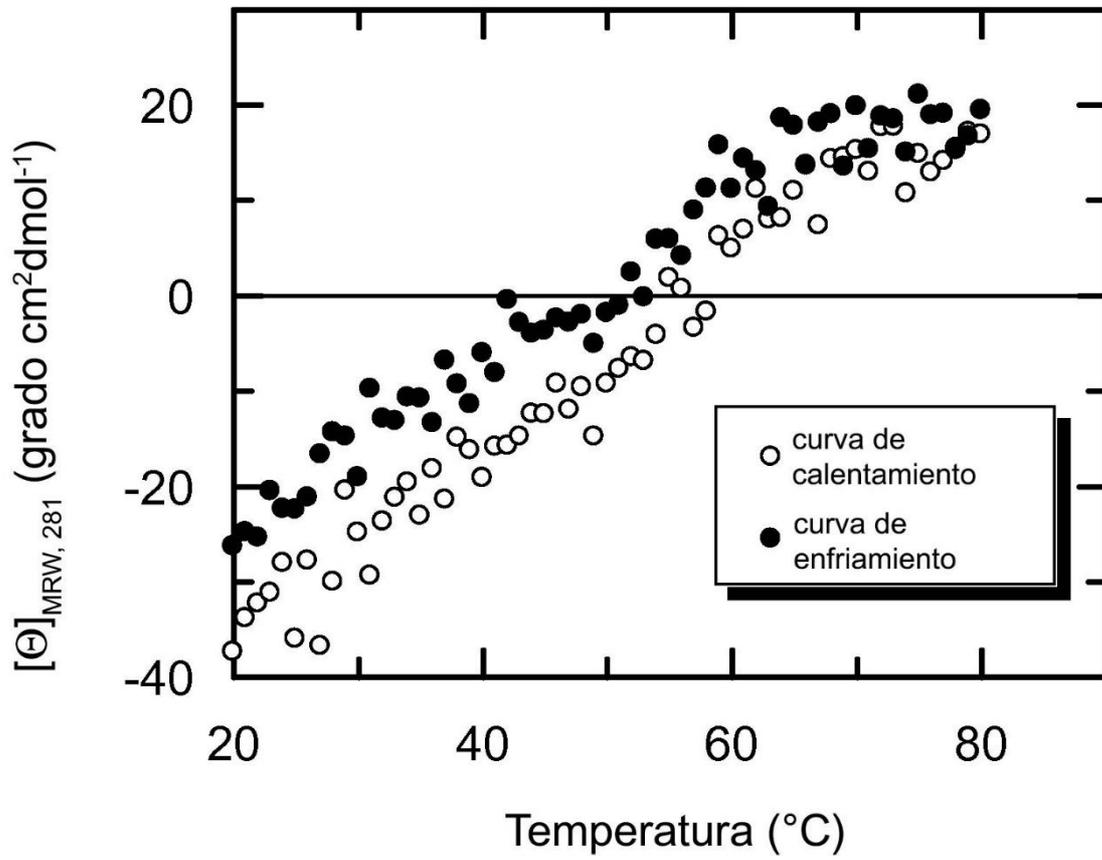


Figura 2/2

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5
<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG
- 10
- <120> Variantes de la lipoproteína 15 de *Vibrio cholerae* como aditivo anti-interferencia en inmunoensayos basados en TpN17 para la detección de anticuerpos anti-*Treponema*
- 15
- <130> 32239 EP-1-IR
- 20
- <160> 12
- 25
- <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1
<211> 163
<212> PRT
- 35 <213> *Vibrio cholerae*
- 40 <400> 1

ES 2 623 891 T3

Met	Met	Lys	Lys	Ser	Ile	Phe	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Leu
1				5					10					15	
Val	Gly	Cys	Asp	Asn	Gln	Gln	Asp	Ala	Lys	Val	Glu	Val	Glu	Lys	Val
			20					25					30		
Val	Asp	Val	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Glu	Gln	Ser	Ala	Ala	Gln	Pro	Ser
		35					40					45			
Thr	Ala	Ser	Val	Asp	Ala	Ala	His	Asn	Ala	Gln	Asn	Ser	Leu	Asp	Trp
	50					55					60				
Ala	Gly	Ile	Tyr	Gln	Gly	Thr	Leu	Pro	Cys	Ala	Asp	Cys	Gly	Gly	Ile
65					70					75					80
Glu	Thr	Glu	Leu	Thr	Leu	Asn	Ala	Asp	Gly	Thr	Tyr	Ala	Leu	Thr	Glu
				85					90					95	
Lys	Tyr	Leu	Asp	Lys	Glu	Gly	Glu	Pro	Phe	Ala	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe
			100					105					110		
Val	Trp	Asn	Glu	Ala	Gly	Asn	Ile	Val	Thr	Leu	Gln	Thr	Gly	Asp	Gln
		115					120					125			
Thr	Gly	Arg	Gln	Phe	Met	Val	Gly	Glu	Asn	Thr	Leu	Ser	His	Leu	Asp
	130					135					140				
Met	Glu	Gly	Lys	Val	Ile	Glu	Gly	Glu	Leu	Ala	Glu	Phe	Tyr	Val	Leu
145					150					155					160
Ser	Lys	Gln													

5 <210> 2

<211> 146

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> VcLp15 con cola de hexa-his en el extremo C-terminal

20

<400> 2

ES 2 623 891 T3

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

- 5 <210> 3
- <211> 334
- <212> PRT
- 10 <213> Artificial
- 15 <220>
- <221> EcS1yD-VcLp15
- 20 <400> 3

ES 2 623 891 T3

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

ES 2 623 891 T3

Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1 5 10 15
Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
20 25 30
Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
35 40 45
Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
50 55 60
Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65 70 75 80
Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
85 90 95
Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala Asn Ser Gln
100 105 110
Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
115 120 125
Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160
Gly Ser Gly Gly Gly Lys Val Glu Val Glu Lys Val Val Asp Val Ala
165 170 175
Ala Ala Pro Ala Glu Gln Ser Ala Ala Gln Pro Ser Thr Ala Ser Val
180 185 190
Asp Ala Ala His Asn Ala Gln Asn Ser Leu Asp Trp Ala Gly Ile Tyr
195 200 205
Gln Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asp Ala Gly Gly Ile Glu Thr Glu Leu
210 215 220
Thr Leu Asn Ala Asp Gly Thr Tyr Ala Leu Thr Glu Lys Tyr Leu Asp
225 230 235 240
Lys Glu Gly Glu Pro Phe Ala Ser Gln Gly Thr Phe Val Trp Asn Glu
245 250 255
Ala Gly Asn Ile Val Thr Leu Gln Thr Gly Asp Gln Thr Gly Arg Gln
260 265 270
Phe Met Val Gly Glu Asn Thr Leu Ser His Leu Asp Met Glu Gly Lys
275 280 285
Val Ile Glu Gly Glu Leu Ala Glu Phe Tyr Val Leu Ser Lys Gln Leu
290 295 300
Glu His His His His His His
305 310

ES 2 623 891 T3

5 <210> 5
 <211> 156
 <212> PRT
 10 <213> *Treponema pallidum*

15 <400> 5

Met Lys Gly Ser Val Arg Ala Leu Cys Ala Phe Leu Gly Val Gly Ala
 1 5 10
 Leu Gly Ser Ala Leu Cys Val Ser Cys Thr Thr Val Cys Pro His Ala
 20 25 30
 Gly Lys Ala Lys Ala Glu Lys Val Glu Cys Ala Leu Lys Gly Gly Ile
 35 40 45
 Phe Arg Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asp Cys Pro Gly Ile Asp Thr Thr
 50 55 60
 Val Thr Phe Asn Ala Asp Gly Thr Ala Gln Lys Val Glu Leu Ala Leu
 65 70 75 80
 Glu Lys Lys Ser Ala Pro Ser Pro Leu Thr Tyr Arg Gly Thr Trp Met
 85 90 95
 Val Arg Glu Asp Gly Ile Val Glu Leu Ser Leu Val Ser Ser Glu Gln
 100 105 110
 Ser Lys Ala Pro His Glu Lys Glu Leu Tyr Glu Leu Ile Asp Ser Asn
 115 120 125
 Ser Val Arg Tyr Met Gly Ala Pro Gly Ala Gly Lys Pro Ser Lys Glu
 130 135 140
 Met Ala Pro Phe Tyr Val Leu Lys Lys Thr Lys Lys
 145 150 155

20
 25 <210> 6
 <211> 134
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

35 <220>
 <223> TpN17 23-156 con mutaciones de Cys a Ala

ES 2 623 891 T3

<400> 6

5

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

130

10

<210> 7

15

<211> 142

<212> PRT

20

<213> Artificial

<220>

25

<223> TpN17 con hexa-his

30

<400> 7

ES 2 623 891 T3

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

5 <210> 8

<211> 517

<212> PRT

10

<213> Artificial

15

<220>

<223> SlyD en tándem de *E. coli* fusionada a TpN17

20

<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

25

ES 2 623 891 T3

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 Val Ser Ala Thr Thr Val Ala Pro His
 370 375 380
 Ala Gly Lys Ala Lys Ala Glu Lys Val Glu Ala Ala Leu Lys Gly Gly
 385 390 395 400

ES 2 623 891 T3

Ile	Phe	Arg	Gly	Thr	Leu	Pro	Ala	Ala	Asp	Ala	Pro	Gly	Ile	Asp	Thr
				405					410					415	
Thr	Val	Thr	Phe	Asn	Ala	Asp	Gly	Thr	Ala	Gln	Lys	Val	Glu	Leu	Ala
			420					425					430		
Leu	Glu	Lys	Lys	Ser	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	Thr	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp
		435					440					445			
Met	Val	Arg	Glu	Asp	Gly	Ile	Val	Glu	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Glu
	450					455						460			
Gln	Ser	Lys	Ala	Pro	His	Glu	Lys	Glu	Leu	Tyr	Glu	Leu	Ile	Asp	Ser
465					470					475					480
Asn	Ser	Val	Arg	Tyr	Met	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Lys	Pro	Ser	Lys
				485					490					495	
Glu	Met	Ala	Pro	Phe	Tyr	Val	Leu	Lys	Lys	Thr	Lys	Lys	Leu	Glu	His
			500					505					510		
His	His	His	His	His											
			515												

5

<210> 9

10 <211> 497

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

20 <223> SlyDen tandem de *Pasteurella multocida*-TpN17

<400> 9

25

ES 2 623 891 T3

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 Gly Gly Ser

ES 2 623 891 T3

145					150						155					160
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
				165					170					175		
Gly	Lys	Ile	Ala	Lys	Asn	Val	Val	Val	Ser	Ile	Ala	Tyr	Gln	Val	Arg	
			180					185					190			
Thr	Glu	Asp	Gly	Val	Leu	Val	Asp	Glu	Ala	Pro	Val	Asn	Gln	Pro	Leu	
		195					200					205				
Glu	Tyr	Leu	Gln	Gly	His	Asn	Asn	Leu	Val	Ile	Gly	Leu	Glu	Asn	Ala	
	210					215					220					
Leu	Glu	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	Asp	Lys	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Lys	Pro	
225					230					235					240	
Glu	Glu	Ala	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Asn	Glu	Asn	Met	Val	Gln	Arg	Val	Pro	
				245					250					255		
Lys	Asp	Val	Phe	Gln	Gly	Val	Asp	Glu	Leu	Val	Val	Gly	Met	Arg	Phe	
			260					265					270			
Ile	Ala	Asp	Thr	Asp	Ile	Gly	Pro	Leu	Pro	Val	Val	Ile	Thr	Glu	Val	
		275					280					285				
Ala	Glu	Asn	Asp	Val	Val	Val	Asp	Gly	Asn	His	Met	Leu	Ala	Gly	Gln	
	290					295					300					
Glu	Leu	Leu	Phe	Ser	Val	Glu	Val	Val	Ala	Thr	Arg	Glu	Ala	Thr	Leu	
305					310					315					320	
Glu	Glu	Ile	Ala	His	Gly	His	Ile	His	Gln	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
				325					330					335		
Gly	Gly	Gly	Ser													
			340					345					350			
Gly	Gly	Gly	Val	Ser	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Pro	His	Ala	Gly	Lys	Ala	
		355					360					365				
Lys	Ala	Glu	Lys	Val	Glu	Ala	Ala	Leu	Lys	Gly	Gly	Ile	Phe	Arg	Gly	
	370					375					380					
Thr	Leu	Pro	Ala	Ala	Asp	Ala	Pro	Gly	Ile	Asp	Thr	Thr	Val	Thr	Phe	
385					390					395					400	
Asn	Ala	Asp	Gly	Thr	Ala	Gln	Lys	Val	Glu	Leu	Ala	Leu	Glu	Lys	Lys	
				405					410					415		
Ser	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	Thr	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	Met	Val	Arg	Glu	
			420					425					430			
Asp	Gly	Ile	Val	Glu	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Glu	Gln	Ser	Lys	Ala	
		435					440					445				
Pro	His	Glu	Lys	Glu	Leu	Tyr	Glu	Leu	Ile	Asp	Ser	Asn	Ser	Val	Arg	
	450					455					460					
Tyr	Met	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Lys	Pro	Ser	Lys	Glu	Met	Ala	Pro	
465					470					475					480	

ES 2 623 891 T3

Phe Tyr Val Leu Lys Lys Thr Lys Lys Leu Glu His His His His His
485 490 495

His

5

<210> 10

<211> 411

10

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> FkpA-TpN17 de *E. coli*

20

<400> 10

25

ES 2 623 891 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 623 891 T3

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Ser Ala
 260 265 270
 Thr Thr Val Ala Pro His Ala Gly Lys Ala Lys Ala Glu Lys Val Glu
 275 280 285
 Ala Ala Leu Lys Gly Gly Ile Phe Arg Gly Thr Leu Pro Ala Ala Asp
 290 295 300
 Ala Pro Gly Ile Asp Thr Thr Val Thr Phe Asn Ala Asp Gly Thr Ala
 305 310 315 320
 Gln Lys Val Glu Leu Ala Leu Glu Lys Lys Ser Ala Pro Ser Pro Leu
 325 330 335
 Thr Tyr Arg Gly Thr Trp Met Val Arg Glu Asp Gly Ile Val Glu Leu
 340 345 350
 Ser Leu Val Ser Ser Glu Gln Ser Lys Ala Pro His Glu Lys Glu Leu
 355 360 365
 Tyr Glu Leu Ile Asp Ser Asn Ser Val Arg Tyr Met Gly Ala Pro Gly
 370 375 380
 Ala Gly Lys Pro Ser Lys Glu Met Ala Pro Phe Tyr Val Leu Lys Lys
 385 390 395 400
 Thr Lys Lys Leu Glu His His His His His His
 405 410

5 <210> 11

<211> 307

<212> PRT

10

<213> Artificial

15

<220>

<223> Skp-TpNq17 de *E. coli*

20

<400> 11

ES 2 623 891 T3

Met Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu Phe Gln Gln
1 5 10 15

Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn Glu Phe Arg
20 25 30

Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu Gln Ala Lys
35 40 45

Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg Thr Lys Leu
50 55 60

Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln Lys Ala Gln
65 70 75 80

Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu Arg Gly Lys
85 90 95

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

Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr Asn Ser Ser
115 120 125

Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val Lys Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Ser Gly Gly Gly Val Ser Ala Thr Thr Val Ala Pro His Ala Gly
165 170 175

Lys Ala Lys Ala Glu Lys Val Glu Ala Ala Leu Lys Gly Gly Ile Phe
180 185 190

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

Thr Phe Asn Ala Asp Gly Thr Ala Gln Lys Val Glu Leu Ala Leu Glu
210 215 220

Lys Lys Ser Ala Pro Ser Pro Leu Thr Tyr Arg Gly Thr Trp Met Val
225 230 235 240

Arg Glu Asp Gly Ile Val Glu Leu Ser Leu Val Ser Ser Glu Gln Ser
245 250 255

Lys Ala Pro His Glu Lys Glu Leu Tyr Glu Leu Ile Asp Ser Asn Ser
260 265 270

Val Arg Tyr Met Gly Ala Pro Gly Ala Gly Lys Pro Ser Lys Glu Met
275 280 285

Ala Pro Phe Tyr Val Leu Lys Lys Thr Lys Lys Leu Glu His His His
290 295 300

His His His
305

<210> 12

5 <211> 23

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

15 <223> Conector rico en glicina

<400> 12

20

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