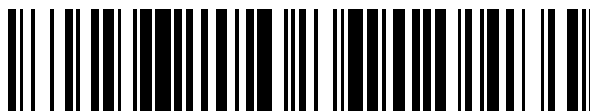


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 611**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2015 PCT/EP2015/053966**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015 WO15128394**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2015 E 15706804 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 3110831**

54 Título: **Variantes solubles e inmunorreactivas del antígeno p24 de la cápside de HTLV**

30 Prioridad:

28.02.2014 EP 14157165

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

09.04.2018

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

FAATZ, ELKE;

MUENCH, PETER y

SCHOLZ, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 662 611 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 solubles e inmunorreactivas del antígeno p24 de la cápside de HTLV

5 El virus linfótrofo de linfocitos T humanos (HTLV) de tipo I (HTLV-I) fue el primer retrovirus que se descubrió en el hombre en 1980. Es el agente causante de la leucemia y/o el linfoma de linfocitos T y de la mielopatía asociada al HTLV, una afección desmielinizante grave que finalmente da lugar a la paraparesia espástica tropical. El riesgo acumulativo de por vida de padecer estas enfermedades mortales e incurables asciende a ~ 5 % en portadores asintomáticos de HTLV-I. El HTLV-I infecta principalmente a los linfocitos T CD4 positivos. También se denomina virus de linfoma de linfocitos T de adultos de tipo 1. El HTLV-II comparte aproximadamente un 70 % de homología genética (que se traduce en un 80-95 % de similitud estructural a nivel de proteína) con el HTLV-I. El potencial patógeno del HTLV-II todavía no se ha dilucidado por completo, pero el HTLV-II se considera un marcador de riesgo para la transfusión sanguínea ya que se encuentra principalmente en toxicómanos por vía intravenosa en todo el mundo (Vandamme *et al.*, Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II, Gene 261 (2000) 171-180).
10
15 Ambos virus se propagan a nivel mundial, pero la prevalencia de HTLV-I es más alta en las regiones de puntos calientes en el sur de Japón (Kyushu, Shikoku y Okinawa), África Subsahariana, el Caribe (Jamaica y Haití) y América del Sur.

20 Los principales modos de transmisión de HTLV-I/II son a través del contacto sexual, la transfusión de sangre, el intercambio de agujas de inyección y la transmisión de madre a hijo a través de la lactancia. El período de seroconversión después de la infección por HTLV es largo en comparación con otras enfermedades infecciosas. El período de margen, es decir, el marco temporal después de la infección dentro del que no se pueden detectar anticuerpos contra el virus puede variar de varias semanas a meses.

25 El cribado de donantes de sangre para HTLV se introdujo por primera vez en Japón en 1986, en los Estados Unidos y Canadá en 1988/1989, en Francia en 1991 y en varios países europeos y sudamericanos después de 1991. Hasta el momento no ha surgido un procedimiento de referencia para el diagnóstico de infección por HTLV. En los últimos años se han presentado varios inmunoensayos basados en antígenos peptídicos recombinantes y/o sintéticos.

30 Los inmunoensayos disponibles comercialmente para detectar anticuerpos anti-HTLV a menudo usan polipéptidos derivados de la envoltura del virus (proteína de superficie gp46 y proteína transmembranaria gp21) o de la proteína de la cápside p24 codificada por gag.

35 Debido al largo tiempo de seroconversión, es importante detectar incluso cantidades muy pequeñas de anticuerpos una vez que aparecen en una fase temprana después de la infección. Por lo tanto, es obligatoria la obtención de antígenos apropiados para un inmunoensayo altamente sensible. Como cuestión de rutina, es deseable cerrar la brecha de diagnóstico entre la infección y la detección, para prevenir la propagación accidental del virus.

40 Se sabe desde hace tiempo que, tras la infección por HTLV, los anticuerpos frente a las proteínas gag aparecen temprano en la seroconversión. En particular, el antígeno p24 de la cápside codificado por gag es una diana temprana preferente de la respuesta inmunitaria humoral (Manns *et al.*, Blood (1991) 77: 896-905. Hasta ahora, las variantes peptídicas y recombinantes de la proteína de la cápside p24 se han usado como antígenos en inmunoensayos. Por medio de estos antígenos, se han detectado inmunoglobulinas anti-p24 del tipo G con alta exactitud y sensibilidad satisfactoria. Los antígenos p24 de la cápside de esta clase, sin embargo, no se pueden unir y detectar inmunoglobulinas del tipo M. Ya que las moléculas de IgM habitualmente aparecen antes de las moléculas de IgG durante la seroconversión, se dedujo que debería valer la pena modificar el antígeno de la cápside p24 recombinante de forma que se reconozca y se una mediante IgM. En resumen, los autores de la presente invención se preguntaron si era posible mejorar la sensibilidad de la detección de inmunoglobulinas anti-p24 mediante la adaptación y genomanipulación del antígeno de la cápside p24. En particular, se buscaba diseñar una variante de p24 que pueda interactuar con y detectar moléculas de IgM.
45
50

55 La técnica anterior incluye el documento JP2000-078973 que divulga un inmunoensayo para HTLV I o II basado en el uso de una proteína de fusión basada en gp21-p19 de HTLV-I o una proteína de fusión basada en gp46-p24-gp46 de HTLV-I.

El problema subyacente de la invención es la obtención de un inmunoensayo para detectar anticuerpos contra HTLV-I y HTLV-II que supere la sensibilidad de seroconversión limitada de los inmunoensayos disponibles hasta ahora.

60 La presente invención resuelve el problema como se especifica en las reivindicaciones.

Sumario de la invención:

65 La invención se refiere a antígenos p24 de HTLV solubles que se fusionan a chaperonas y a su uso en aplicaciones de diagnóstico tales como inmunoensayos para detectar anticuerpos contra HTLV-I o HTLV-II en una muestra biológica aislada. La divulgación se refiere a fragmentos de antígeno p24 de HTLV-I o HTLV-II solubles que comprenden ya sea el dominio N- o C-terminal de la secuencia p24 en los que el fragmento de antígeno p24 de HTLV se puede fusionar

a una chaperona. Por otro lado, la divulgación incluye moléculas de ADN recombinante que codifican estos antígenos de fusión de HTLV-I y -II, así como su producción recombinante usando vectores de expresión y células huésped transformadas con dichos vectores de expresión. Asimismo, la divulgación se centra en composiciones de varios de estos antígenos p24 de HTLV y en un procedimiento de inmunoensayo para la detección de anticuerpos de HTLV usando los antígenos de la invención. También se abarca el uso de antígenos p24 de HTLV en un ensayo de diagnóstico *in vitro*, así como un kit de reactivos para la detección de anticuerpos anti-HTLV que comprende dichos antígenos p24 de HTLV.

Leyenda de las secuencias de aminoácidos divulgadas:

SEQ ID NO. 1: p24/HTLV-I (146-344)/P10274, 199 residuos de aminoácidos

Muestra la secuencia de p24 de HTLV-I extraída de la base de datos SwissProt, n.º de identificación P10274 (poliproteína Gag-Pro del virus 1 de la leucemia de linfocitos T humanos 146-344, cepa japonesa ATK-1 subtipo A). La numeración se refiere al precursor de poliproteína inmadura (la secuencia de aa 1-130 se refiere a la proteína de la matriz p19). Obsérvese que se han omitido los 15 residuos de aminoácidos N-terminales de aa 131-145 (secuencia rica en prolina).

```
QMKDLQAIKQ EVSQAAPGSP QFMQTIRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVASLHHQQL
DSLISEAETR GITGYNPLAG PLRVQANNPQ QQGLRREYQQ LWLAFAALP GSAKDPSWAS
ILQGLEEPYH AFVERLNIAL DNGLPEGTPK DPILRSLAYS NANKECQKLL QARGHTNSPL
GDMLRACQW TPKDKTKVL
```

SEQ ID NO. 2: p24 NTD (146-260)/HTLV-I, 115 residuos de aminoácidos

Muestra el dominio N-terminal de p24 de HTLV-I de los aminoácidos 146-260 (para la numeración de las posiciones de aminoácidos, véase también SEQ ID NO. 1). Obsérvese que una posición está marcada con X (subrayada) lo que significa que el residuo de cisteína de la secuencia natural se puede reemplazar por una alanina o serina (X = C, A o S).

```
QMKDLQAIKQ EVSQAAPGSP QFMQTIRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVASLHHQQL
DSLISEAETR GITGYNPLAG PLRVQANNPQ QQGLRREYQQ LWLAFAALP GSAKD
```

SEQ ID NO. 3: p24 CTD (261-344)/HTLV-I, 84 residuos de aminoácidos

Muestra el dominio C-terminal de p24 de HTLV-I de los residuos de aminoácidos 261-344 (para la numeración de las posiciones de aminoácidos, véase también SEQ ID NO. 1). Obsérvese que dos posiciones están marcadas con X (subrayada) lo que significa que los residuos de cisteína de la secuencia natural se pueden reemplazar por alanina o serina (X = C, A o S).

```
PSWASILQGL EEPYHAFVER LNIALDNGLP EGTPKDPILR SLAYSNANKE XQKLLQARGH
TNSPLGDMLR AXQTWTPKDK TKVL
```

SEQ ID NO. 4: p24 (146-344)/HTLV-I, 199 residuos de aminoácidos

Muestra la secuencia de p24 de HTLV-I similar a SEQ ID NO. 1 con respecto a la longitud y la posición. Sin embargo, tres posiciones de aminoácidos muestran una X (subrayada) lo que significa que en estas posiciones las cisteínas naturales (posiciones n.º 193, 311 y 332 numeradas de acuerdo con la secuencia del polipéptido precursor) se pueden sustituir por alanina o serina (X = C, A o S).

```
QMKDLQAIKQ EVSQAAPGSP QFMQTIRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVASLHHQQL
DSLISEAETR GITGYNPLAG PLRVQANNPQ QQGLRREYQQ LWLAFAALP GSAKDPSWAS
ILQGLEEPYH AFVERLNIAL DNGLPEGTPK DPILRSLAYS NANKECXKLL QARGHTNSPL
GDMLRAXQW TPKDKTKVL
```

SEQ ID NO. 5: p24/HTLV-II (152-350)/P03353, 199 residuos de aminoácidos

Muestra la secuencia de p24 de HTLV-II extraída de la base de datos SwissProt, n.º de identificación P03353 (poliproteína Gag-Pro del virus 2 de la leucemia de linfocitos T humanos 152-3350). La numeración se refiere al precursor de poliproteína inmadura (la secuencia de aa 1-136 se refiere a la proteína de la matriz p19). Obsérvese que se han omitido los 15 aminoácidos N-terminales de aa 137-151 (secuencia rica en prolina).

```
QMKDLQAIKQ EVSSSALGSP QFMQTLRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVVSLHHQQL
NTLITEAETR GMTGYNPMAG PLRMQANNPA QQGLRREYQN LWLAFASTLP GNTRDPSWAA
ILQGLEEPC AFVERLNVAL DNGLPEGTPK EPILRSLAYS NANKECQKIL QARGHTNSPL
GEMLRTCQAW TPKDKTKVL
```

SEQ ID NO. 6: p24 NTD (152-266)/HTLV-II, 115 residuos de aminoácidos

Muestra el dominio N-terminal de p24 de HTLV-II del aminoácido 152-266 (para la numeración de las posiciones de aminoácidos, véase también SEQ ID NO. 5). Obsérvese que una posición está marcada con X (subrayada) lo que significa que el residuo de cisteína de la secuencia natural se puede reemplazar por una alanina o serina (X = C, A o S).

QMKDLQAIKQ EVSSSALGSP QFMQTLRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVVSLHHQQL
NTLITEAETR GMTGYNPMAG PLRMQANNPA QQGLRREYQN LWLAAFSTLP GNTRD

SEQ ID NO. 7: p24 CTD (267-350)/HTLV-II, 84 residuos de aminoácidos

Muestra el dominio C-terminal de p24 de HTLV-II del aminoácido 267-350 (para la numeración de las posiciones de aminoácidos, véase también SEQ ID NO. 5). Obsérvese que tres posiciones están marcadas con X (subrayada), lo que significa que los residuos de cisteína de la secuencia natural se pueden reemplazar por alanina o serina (X = C, A o S).

PSWAAILQGL BEPYXAFVER LINVALDNGLP EGTPKEPILR SLAYSANANKE XQKILQARGH
TNSPLGEMLR TXQAWTPKDK TKVL

SEQ ID NO. 8: p24 (152-350)/HTLV-II, 199 residuos de aminoácidos

Muestra la secuencia de p24 de HTLV-II similar a SEQ ID NO. 5 con respecto a la longitud y la posición. Cuatro posiciones de aminoácidos muestran una X (subrayada) lo que significa que en estas posiciones las cisteínas naturales (posiciones n.º 199, 281, 317 y 338 numeradas de acuerdo con la secuencia del polipéptido precursor) se pueden sustituir por alanina o serina (X = C, A o S).

QMKDLQAIKQ EVSSSALGSP QFMQTLRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVVSLHHQQL
NTLITEAETR GMTGYNPMAG PLRMQANNPA QQGLRREYQN LWLAAFSTLP GNTRDPSWAA
ILQGLEEPYX AFVERLINVAL DNGLPEGTPK EPILRSLAYS NANKEXQKIL QARGHTNSPL
GEMLRTXQAW TPKDKTKVL

Las siguientes secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO. 9-16 y 18-24) muestran secuencias de fusión de secuencias de p24 de HTLV-I o HTLV-II (completas o parciales) como se usan en la sección de ejemplos. Las dos letras *Ec* en las designaciones de proteínas para *EcSlyD*, *EcFkpA* y *EcSlyD* indican el origen de la secuencia de la proteína de *Escherichia coli*. Cada proteína lleva un identificador de hexahistidina en su extremo C-terminal que se usa para facilitar la purificación y el replegamiento de proteínas.

SEQ ID NO. 9: *EcSlyD*-*EcSlyD*-p24(146-344)/HTLV-I

MKVAKDLVVS LAYQVTEDEG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETEALE GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLEAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHD DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
SGGGSGGGK AKDLVVSLEY QVTEDEGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETEALEGHE
VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHHD HDGGGSGGG
GGGGSGGGSG GSGGGQMKDL QAIKQEVSA APGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
YLASSLVASL HHQQLDSLIS EAETRGITGY NPLAGPLRVQ ANNPQQGLR REYQQLWLAA
FAALPGSAKD PSWASILQGL EEPYHAFVER LNALDNGLP EGTPKDPILR SLAYSANANKE
AQKLLQARGH TNSPLGDMRL AAQTWTPKDK TKVLLEHHHH HH

SEQ ID NO. 10: *EcFkpA*-p24(146-344)/HTLV-I

MAEAAPATT ADSKAAFKNL DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGKIL DKDQLIAGVQ
DAFADKSKLS DQIEIQTQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
GLKNIKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVVKPAPKA DAKPEADAKA
ADSAKGGGS GGGSGGGSG GSGGGSGGGQ MKDLQAIKQE VSQAAPGSPQ FMQTIRLAVQ
QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VASLHHQQLD SLISEAETRG ITGYNPLAGP LRVQANNPQQ
QQGLRREYQQL WLAFAALPG SAKDPSWASI LQGLEEPYHA FVERLNLIALD NGLPEGTPKD
PILRSLAYSAN ANKEAQKLLQ ARGHTNSPLG DMLRAAQWTW PKDKTKVLE HHHHHH

SEQ ID NO. 11: *EcSlyD*-*EcSlyD*-p24/CTD(258-344)/HTLV-I

MKVAKDLVVS LAYQVREDG VLVDSPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLEAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHD DHDHGGGGSG GSGGGGGGGG
 SGGSGGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVVKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHHD HDGGGGGGGG
 GGGSGGGSGG GSGGGAKDPS WASILQGLEE PYHAFVERLN IALDNGLPEG TPKDPILRSL
 AYSNANKEAQ KLLQARGHTN SPLGDMLRAA QTWTPKDKTK VLEHHHHHH

SEQ ID NO. 12: *EcFkpA-p24/CTD(258-344)/HTLV-I*

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVI PGWTE
 GLKNIKKGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGA KDPSWASILQ GLEEPYHAFV ERLNIALDNG
 LPEGTPKDPI LRSLAYSANAN KEAQKLLQAR GHTNSPLGDM LRAAQTWTPK DKTKVLEHHH
 HHH

5

SEQ ID NO. 13: *EcSklp-p24/CTD(258-344)/HTLV-I*

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFQAQKAQ AFEQDRARRS NEERGLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDITADVLRKQ VKGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGAKDPS WASILQGLEE
 PYHAFVERLN IALDNGLPEG TPKDPILRSL AYSNANKEAQ KLLQARGHTN SPLGDMLRAA
 QTWTPKDKTK VLEHHHHHH

10

SEQ ID NO. 14: *EcSlyD-EcSlyD-p24/NTD(146-260)/HTLV-I*

MKVAKDLVVS LAYQVREDG VLVDSPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLEAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHD DHDHGGGGSG GSGGGGGGGG
 SGGSGGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVVKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHHD HDGGGGGGGG
 GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSAQ AFGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
 YLASSLVASL HHQQLDSLIS EAETRITGY NPLAGPLRVQ ANNPQQQGLR REYQQLWLAA
 FAALPGSAKD LEHHHHHH

15

SEQ ID NO. 15: *EcFkpA-p24/NTD(146-260)/HTLV-I*

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVI PGWTE
 GLKNIKKGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGQ MKDLQAIKQE VSQAAPGSPQ FMQTIRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VASLHHQQLD SLISEAETRIG ITGYNPLAGP LRVQANNPQQ
 QGLRREYQQL WLAFAALPG SAKDLEHHHH HH

20

SEQ ID NO. 16: *EcSklp-p24/NTD(146-260)/HTLV-I*

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFQAQKAQ AFEQDRARRS NEERGLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDITADVLRKQ VKGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSAQ
 AFGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ YLASSLVASL HHQQLDSLIS EAETRITGY
 NPLAGPLRVQ ANNPQQQGLR REYQQLWLAA FAALPGSAKD LEHHHHHH

SEQ ID NO. 17: un conector rico en glicina entre polipéptidos fusionados (véase el ejemplo 1)

25

GGGSGGGSGG GSGGGSGGG GGG

SEQ ID NO. 18: *EcSlyD-EcSlyD-p24(152-350)/HTLV-II*

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDSPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG FVHGAHDHHD DHDHGGGGSG GSGGGGGGGG
 SGGGGGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVVKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIRBAT EEELAHGHVH GAHDHHDHHD HDGGGGGGGS
 GGGGGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSSS ALGSPQFMQT LRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
 YLASSLVVSL HHQQLNLTIT EAETRGMGTGY NPMAGPLRMQ ANNPAQQGLR REYQNLWLAA
 FSTLPGNTRD PSWAAILQGL EEPYAAFVER LNVALDNGLP EGTPEKPIILR SLAYSANANKE
 AQKILQARGH TNSPLGEMLR TAQAWTPKDK TKVLEHHHHH HH

SEQ ID NO. 19: EcFkpA-p24(152-350)/HTLV-II

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVI PGWTE
 GLKNIKGGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGQ MKDLQAIKQE VSSSALGSPQ FMQTLRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VVSLHHQQLN TLITEAETRG MTGYNPMAGP LRMQANNPAQ
 QGLRREYQNL WLAASFSTLPG NTRDPSWAAI LQGLEEPYAA FVERLNVALD NGLPEGTPKE
 5 PILRSLAYSAN ANKEAQKILQ ARGHTNSPLG EMLRTAQAWT PKDKTKVLE HHHHHH

SEQ ID NO. 20: EcSkp-p24(152-350)/HTLV-II

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFAQKAQ AFEQDRARRS NEERKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDITADVLKQ VKGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSSS
 ALGSPQFMQT LRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ YLASSLVVSL HHQQLNLTIT EAETRGMGTGY
 NPMAGPLRMQ ANNPAQQGLR REYQNLWLAA FSTLPGNTRD PSWAAILQGL EEPYAAFVER
 LNVALDNGLP EGTPEKPIILR SLAYSANANKE AQKILQARGH TNSPLGEMLR TAQAWTPKDK
 10 TKVLEHHHHH HH

SEQ ID NO. 21: EcFkpA-p24/CTD(267-350)/HTLV-II

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVI PGWTE
 GLKNIKGGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGP SWAAILQGLE EEPYAAFVERL NVALDNGLPE
 GTPKEPIILRS LAYSANANKE QKILQARGHT NSPLGEMLRT AQAWTPKDKT KVLEHHHHHH
 H

15 SEQ ID NO. 22: EcSkp-p24/CTD(267-350)/HTLV-II

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFAQKAQ AFEQDRARRS NEERKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDITADVLKQ VKGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGPSWAA ILQGLEEYAA
 AFVERLNVAL DNGLPEGTPK EPILRSLAYS NANKEAQKIL QARGHTNSPL GEMLRTAQAW
 TPKDKTKVLL EHHHHHH

20 SEQ ID NO. 23: EcFkpA-p24/NTD(152-266)/HTLV-II

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVI PGWTE
 GLKNIKGGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGQ MKDLQAIKQE VSSSALGSPQ FMQTLRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VVSLHHQQLN TLITEAETRG MTGYNPMAGP LRMQANNPAQ
 QGLRREYQNL WLAASFSTLPG NTRDLEHHHH HH

SEQ ID NO. 24: EcSkp-p24/NTD(152-266)/HTLV-II

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFAQKAQ AFEQDRARRS NEERKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDITADVLKQ VKGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSSS
 ALGSPQFMQT LRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ YLASSLVVSL HHQQLNLTIT EAETRGMGTGY
 25 NPMAGPLRMQ ANNPAQQGLR REYQNLWLAA FSTLPGNTRD LEHHHHHH

SEQ ID NO. 25: gp21/HTLV-1 (339-446)/P14075, 108 residuos de aminoácidos

Muestra los residuos de aminoácidos n.º 339-446 de la glucoproteína gp21 de la envoltura (derivada del precursor de

la poliproteína env) de acuerdo con la identificación de entrada SwissProt P14075. El precursor de la poliproteína completo comprende: proteína de superficie (=glucoproteína 46, gp46) y proteína transmembranaria (=glucoproteína 21, gp21) del virus I de la leucemia de linfocitos T humanos (aislado de HS-35 subtipo A del Caribe). Obsérvese que tres residuos están marcados con X (subrayada) lo que significa que el residuo de cisteína de la secuencia natural se puede reemplazar por una alanina o serina (X = C, A o S).

SLASGKSL^{XX}LLH EVDKDISQLT QAI^XVKNHKNL LKIAQYAAQN RRGLDLLFWE QGGL^XKALQE
Q^{XX}FLNITNS HVSILQERPP LENRVLTGWG LNWDLGLSQW AREALQTG

La gp21 de HTLV también se puede aplicar ventajosamente como un polipéptido de fusión de chaperona potenciado en solubilidad como se muestra, por ejemplo, en SEQ ID NO. 26 y 27

SEQ ID NO. 26: EcSlyD-gp21(339-446)/HTLV-I

MKVAKDLVVS LAYQV^{RT}EDG VLVD^{ES}PVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGD^KKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVF^{MG}VDEL QVGM^RFLAET DQGPV^PVEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGGGGGG
SGGGSGGGSL ASGKSL^LLHEV DKDISQLTQA IVKNHKNLLK IAQYAAQ^NRR GLDLLFWEQ^G
GLAKALQEQA AFLNITNSHV SILQERPPLE NRVLTGWGLN WDLGLSQWAR EALQTGLEHH
HHHH

SEQ ID NO. 27: EcSlpA-gp21(339-446)/HTLV-I

SESVQNSA VLVHFTL^KLD DGT^{TA}ESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK
TTFSLEPDAA FGVSPDLIQ YFSRREFMDA GEPEIGAIML FTAMDGSEMP GVIREINGDS
ITVDFNHPLA GQTVHFDIEV LEIDPALEGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSLASGKSL^L
HEVDKDISQL TQAI^VKNHKN LKIAQYAAQ NRRGLDLLFW EQGGLAKALQ EQAAFLNITN
SHVSILQERP PLENRVLTGW GLNWDLGLSQ WAREALQTGL EHHHHHH

Leyenda de las figuras:

La fig. 1 muestra el espectro de CD UV cercano de Skp-p24/CTD (267-350), SEQ ID NO. 22.

La fig. 2 muestra la curva de fusión de Skp-p24/CTD (SEQ ID NO. 22). El desplegamiento y el replegamiento inducidos térmicamente se controlan mediante espectroscopia de CD UV cercano a 277 nm.

La fig. 3 muestra el espectro de CD UV cercano de FkpA-p24/CTD (267-350), SEQ ID NO. 21.

La fig. 4 muestra que la señal de CD UV cercano de la molécula de FkpA-p24/CTD natural se restaura completamente después de un ciclo de desplegamiento/replegamiento inducido térmicamente.

Descripción detallada de la invención

p24 de HTLV es un antígeno crítico para la detección de anticuerpos anti-HTLV. La proteína de la cápside p24 se conoce en la técnica desde hace mucho tiempo y se ha usado en inmunoensayos para la detección de anticuerpos anti-HTLV (Manns *et al.*, Blood (1991) 77: 896-905. Los inmunoensayos para la detección de moléculas tanto de IgG como de IgM requieren un conjunto de antígenos que se reconocen y se unen no solo mediante moléculas de IgG sino también mediante moléculas de IgM. Las moléculas de IgM típicamente se producen en la fase temprana de la seroconversión tras la infección con HTLV. La unión de las moléculas de IgM polivalente es esencialmente dependiente de una alta densidad de epítipo de antígeno. Por tanto, es imperativo que los antígenos diseñados para la detección específica de moléculas de IgM posean y exhiban dicha alta densidad de epítipo.

Una forma convencional de generar módulos de detección de IgM con alta densidad de epítipo sería polimerizar antígenos monoméricos por medio de reticulación química. Existe una gran cantidad de reticuladores homobifuncionales y heterobifuncionales que se pueden usar con gran ventaja y que se conocen bien en la técnica. No obstante, existen algunos inconvenientes graves en la polimerización de antígenos químicamente inducida para su uso como especificadores en ensayos serológicos. Por ejemplo, la inserción de restos reticuladores en antígenos puede comprometer la antigenicidad al interferir con la conformación de tipo natural o al enmascarar epítopos críticos. Además, la introducción de contactos terciarios no naturales puede interferir con la reversibilidad del plegamiento/desplegamiento de proteínas, y puede ser, adicionalmente, la fuente de problemas de interferencia que se deben superar mediante estrategias antiinterferentes en la mezcla de inmunoensayo.

Una técnica más reciente para generar módulos de detección de IgM es fusionar el antígeno de interés a una chaperona oligomérica, transmitiendo de ese modo una alta densidad de epítipo al antígeno. La ventaja de esta tecnología radica en su alta reproducibilidad y en la función triple de la pareja de fusión de chaperona oligomérica: en primer lugar, la chaperona potencia la tasa de expresión del polipéptido de fusión en la célula huésped, en segundo lugar, la chaperona facilita el proceso de replegamiento del antígeno diana y potencia su solubilidad global y, en tercer

lugar, ensambla el antígeno diana de forma reproducible en una estructura oligomérica ordenada.

La publicación de solicitud de patente europea n.º EP1982993A2 divulga un procedimiento y recursos para la detección temprana de infecciones primarias verdaderas por patógenos tales como citomegalovirus humano usando antígenos que se fusionan a chaperonas oligoméricas. Sin embargo, esta publicación no menciona la detección de infección por HTLV.

Los intentos iniciales de los autores de la presente invención con la versión de longitud completa de p24 de HTLV habían revelado que esta proteína exhibe una alta solubilidad cuando se fusiona a *EcSlyD-EcSlyD* o *EcFkpA* como una chaperona. Sin embargo, su solubilidad se limitó cuando se fusionó p24 a la chaperona Skp trimérica. Es evidente en sí mismo que la solubilidad de todos los compuestos es una característica esencial para aplicaciones de inmunoensayo heterogéneas. Los procesos de agregación de ingredientes proteínicos en inmunoensayos habitualmente dan como resultado una pérdida de señal (debido a la pérdida de epítopos) y una pérdida de especificidad (debido a la unión inespecífica del agregado de antígeno marcado a la fase sólida). Se observó que el p24 de longitud completa de HTLV, cuando se fusiona a la chaperona oligomérica *EcSkp*, muestra una tendencia a agregarse en tampón fisiológico a temperatura ambiente. Por tanto, la variante de p24 de longitud completa se excluyó en alguna medida de las aplicaciones simples y sencillas en un inmunoensayo de IgM sensible.

En lugar de centrarse en la versión completa de p24, en esta ocasión se intentó diseñar fragmentos truncados, pero conformacionalmente plegados de p24. En otras palabras, se buscaba usar dominios de proteínas en lugar de la proteína p24 de longitud completa como base para la obtención de antígenos. Un dominio de proteína es una entidad que se pliega de forma autónoma dentro de una estructura de proteína, es decir, un dominio de proteína no depende de otras partes o regiones de la proteína en su plegamiento. Hasta la fecha, se han dilucidado muchos dominios de proteínas naturales, que varían en tamaño desde ~40 residuos de aminoácidos (dominio WW) hasta más de 300 residuos de aminoácidos. También se ha demostrado que se pueden diseñar dominios de proteínas muy pequeños pero estables desde cero: se ha mostrado que las secuencias polipeptídicas artificiales con longitudes de fragmento de secuencias de 23-28 aminoácidos se pliegan de forma cooperativa y poseen las características particulares de los dominios de proteínas (Struthers, M.D. *et al.*, Design of a monomeric 23-residue polypeptide with defined tertiary structure, *Science* (1996) 271 (5247) 342-345; Dahiyat, B. I. y Mayo, S.L., *De novo* protein design: fully automated sequence selection, *Science* (1997) 278 (5335) 82-87; Dahiyat, B.I. *et al.*, *De novo* protein design: towards fully automated protein design, *J. Mol. Biol.* (1997) 273 (4) 789-796). A partir de consideraciones teóricas y evidencias experimentales, se supone que el requisito de longitud mínima para un dominio de proteína es de alrededor de 25 residuos de aminoácidos (Porter L. L. y Rose, G. D., A thermodynamic definition of protein domains, *PNAS* (2012) 109 (24), 9420-9425).

En el *Journal of Molecular Biology* (1999) del 13 de agosto; 291(2):491-505, Khorasanizadeh *et al.*, presentan la estructura de RMN de la proteína p24 de la cápside y revelan la topología del dominio de esta proteína. De acuerdo con este trabajo, p24 de HTLV-I es en su mayor parte helicoidal y consiste en dos dominios bien separados, es decir, p24 comprende dos unidades de plegado autónomas bien definidas. El dominio N-terminal (NTD) alberga las hélices 1-7, mientras que el dominio C-terminal (CTD) comprende las hélices 8-12. Los autores de la presente invención se preguntaron si era factible expresar los dos dominios individualmente en *E. coli*, y si serían capaces de obtener fusiones oligoméricas polipeptídicas de chaperona en una forma soluble y antigénica.

Khorasanizadeh *et al.*, no mencionan las propiedades antigénicas (por ejemplo, epítopos de linfocitos B) de p24 ni ninguna aplicación de diagnóstico de la proteína de la cápside de HTLV caracterizada por RMN. Ha sido impredecible a partir de la mera estructura de solución tridimensional del antígeno de la cápside p24 si su antigenicidad reside principalmente en el dominio N-terminal (NTD) o en el dominio C-terminal (CTD) o si sus epítopos de linfocitos B se propagan uniformemente por toda la molécula.

Sorprendentemente, los autores de la presente invención fueron capaces de expresar los dominios aislados de p24 de HTLV NTD y CTD en fusión con módulos de chaperona tales como *SlyD*, *FkpA* y *Skp*. Como se puede ver en la sección de ejemplos, todas estas construcciones se pudieron purificar hasta la homogeneidad, eran muy solubles y los autores de la presente invención fueron capaces de evaluarlas en cuanto a su antigenicidad con sueros humanos positivos anti-HTLV en un analizador de inmunoensayo automatizado. Los resultados fueron bastante claros: la antigenicidad era bastante alta para ambos dominios e incluso era ligeramente más alta para el dominio C (CTD). De modo impresionante, el NTD podía identificarse como precario con respecto a los valores en blanco, que aumentaron significativamente en comparación con el CTD. El CTD exhibió una excelente dinámica de señal en que generó señales altas con sueros positivos y señales muy bajas con sueros negativos. Esto es sorprendente, ya que se presume que el CTD alberga un motivo de dimerización natural necesario para el ensamblaje de la cápside p24. En virtud de su comportamiento de oligomerización natural, los autores de la presente invención habían deducido que el CTD exhibiría una tendencia de agregación que es significativamente más alta que la tendencia de agregación del NTD.

Cuando se evaluaron el CTD y el NTD de p24 con sueros de seroconversión de conejo anti-HTLV (no existen paneles de seroconversión de HTLV humanos disponibles comercialmente, por lo que se tuvo que recurrir a un modelo de conejo artificial), se encontró que el uso de variantes de p24 oligoméricas inducidas por chaperonas en ambos lados

de un ensayo DAGS potencia tremendamente la sensibilidad del inmunoensayo. Las muestras de seroconversión se reconocen mucho mejor con las variantes oligoméricas de p24 que con las variantes monoméricas de p24.

5 En resumen, los dominios C de p24 de HTLV-I y HTLV-II se identificaron como fragmentos de p24 con alta antigenicidad y alta solubilidad. Cuando se fusiona a chaperonas tales como SlyD, FkpA o Skp, el CTD de p24 permanece soluble, estable y es muy adecuado para la detección de moléculas de IgM que se producen típicamente en la fase temprana de la seroconversión tras la infección con HTLV. Por lo tanto, en particular las variantes de fusión oligoméricas FkpA y Skp de CTD de p24 pueden servir para potenciar la sensibilidad de los inmunoensayos de HTLV.

10 Se han obtenido variantes de la proteína p24 de la cápside de HTLV que son más solubles y significativamente menos propensas a la agregación que la molécula de p24 de longitud completa. La solubilidad y la estabilidad se mejoran a expensas de la antigenicidad, sin embargo, las variantes de p24 recientemente obtenidas son prometedoras como antígenos en inmunoensayos de HTLV, ya que se sobreexpresan abundantemente en *E. coli*, se purifican fácilmente y se repliegan por medio de cromatografía de quelatos metálicos inmovilizados (IMAC), exhiben propiedades satisfactorias de estabilidad y se pueden usar para detectar de forma fiable anticuerpos anti-HTLV en sueros humanos (presumiblemente en combinación con el ectodominio de gp21, otra proteína inmunodominante de HTLV). Es de suma importancia que, por ejemplo, las proteínas de fusión FkpA-p24/CTD y Skp-p24/CTD formen oligómeros naturales con densidades de epítipo que sean suficientes para detectar moléculas de IgM. Ya que el objetivo de los autores de la presente invención era obtener un inmunoensayo para la detección de inmunoglobulina total (es decir, la detección de IgG e IgM), las especies oligoméricas FkpA-p24/CTD y Skp-p24/CTD se pueden usar ventajosamente como especificadores en ambos lados de un formato DAGS (por ejemplo, FkpA-p24/CTD-biotina y Skp-p24/CTD-rutenio). Los datos preliminares sugieren que el uso de variantes oligoméricas de p24 asegura una excelente sensibilidad de seroconversión que no tiene comparación con los ensayos de la competencia.

25 La divulgación se refiere a antígenos p24 de HTLV solubles que comprenden el dominio N-terminal y carecen del dominio C-terminal o que comprenden el dominio C-terminal del polipéptido p24 de HTLV de longitud completa y carecen del dominio N-terminal, respectivamente.

30 Los antígenos p24 se pueden fusionar a chaperonas. También se abarca el uso de estos antígenos p24 de HTLV en aplicaciones de diagnóstico tales como inmunoensayos para detectar anticuerpos contra HTLV-I o HTLV-II en una muestra biológica aislada. El término "HTLV" significa "virus linfótrofo de linfocitos T humanos". A menos que se indique específicamente como HTLV-I o HTLV-II, el término HTLV se refiere a ambos tipos de virus.

35 De acuerdo con la divulgación, el antígeno comprende solo un determinado dominio del antígeno p24 de HTLV completo tal como el dominio N-terminal (NTD) o el dominio C-terminal (CTD). Preferentemente, el antígeno comprende el dominio N-terminal de SEQ ID NO. 2 o el dominio C-terminal de SEQ ID NO. 3 de p24 de HTLV-I. Para el antígeno de HTLV-II, el antígeno de fusión comprende preferentemente el dominio N-terminal de SEQ ID NO. 6 o el dominio C-terminal de SEQ ID NO. 7. En un modo preferente adicional, si el dominio N-terminal es parte del antígeno, falta el dominio C-terminal y viceversa.

40 En particular, la divulgación se refiere a un antígeno p24 de HTLV soluble que comprende el dominio N-terminal (NTD) de p24 de HTLV como se especifica en SEQ ID NO. 2 (NTD de p24 de HTLV-I) o SEQ ID NO. 6 (NTD de p24 de HTLV-II) en el que dicho antígeno p24 de HTLV carece del dominio C-terminal (CTD) como se especifica en SEQ ID NO. 3 (CTD de p24 de HTLV-I) y en SEQ ID NO. 7 (CTD de p24 de HTLV-II).

45 La invención se refiere a un antígeno p24 de HTLV soluble que consiste en el dominio C-terminal de p24 de HTLV como se especifica en SEQ ID NO. 3 (CTD de p24 de HTLV-I) o SEQ ID NO. 7 (CTD de p24 de HTLV-II) en el que dicho antígeno p24 de HTLV carece del dominio N-terminal como se especifica en SEQ ID NO. 2 (NTD de p24 de HTLV-I) y en SEQ ID NO. 6 (NTD de p24 de HTLV-II). El término antígeno p24 de HTLV abarca también las variantes. Las variantes de p24 de HTLV se pueden crear fácilmente por una persona experta en la técnica mediante sustituciones conservadoras u homólogas de las secuencias de aminoácidos divulgadas (tales como, por ejemplo, sustituciones de una cisteína por alanina o serina). El término "variantes" en este contexto también se refiere a una proteína o a un fragmento de proteína (es decir, un polipéptido o péptido) sustancialmente similar a dicha proteína. Por ejemplo, modificaciones tales como truncamientos C- o N-terminales en 1 a 10 aminoácidos están dentro del alcance de los antígenos p24 de HTLV reivindicados. En particular, una variante puede ser una isoforma que muestra intercambios, eliminaciones o inserciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la isoforma de proteína más prevalente. En un modo de realización, dicha proteína sustancialmente similar tiene una similitud de secuencia con la isoforma más prevalente de la proteína de al menos un 80 %, en otro modo de realización al menos un 85 % o al menos un 90 %, en todavía otro modo de realización al menos un 95 %. El término "variante" también se refiere a una proteína modificada por vía postraduccional, tal como una proteína glucosilada o fosforilada. De acuerdo con la invención, una variante se clasifica como una variante del antígeno p24 de HTLV siempre que se mantenga la inmunorreactividad en un inmunoensayo de diagnóstico *in vitro*, es decir, la variante aún se puede unir y detectar anticuerpos anti-p24 de HTLV presentes en una muestra aislada. Una "variante" es también una proteína o antígeno que se ha modificado, por ejemplo, mediante unión covalente o no covalente de un marcador o un resto transportador a la proteína o antígeno. Los posibles marcadores son radiactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, electroquimioluminiscentes, enzimas u otros, por ejemplo, como digoxigenina o biotina. Estos marcadores se conocen

por los expertos en la técnica.

5 Los antígenos p24 de HTLV de la presente invención son solubles, estables e inmunorreactivos, es decir, son adecuados como antígenos para su uso en un ensayo inmunológico. Esto significa que los antígenos de acuerdo con la invención son solubles bajo condiciones de tampón fisiológico, por ejemplo, en un sistema tampón de fosfato a temperatura ambiente sin adición de detergentes. Los antígenos también se pueden unir a o se reconocen y se unen mediante anticuerpos específicos para p24 de HTLV, como por ejemplo, anticuerpos anti-p24 presentes en una muestra aislada tal como sueros humanos.

10 Los antígenos p24 de HTLV de acuerdo con la invención se pueden fusionar a una chaperona. El término "proteína de fusión", "polipéptido de fusión" o "antígeno de fusión" como se usa en la presente invención se refiere a una proteína que comprende al menos una parte proteínica correspondiente a un polipéptido p24 de HTLV y al menos una parte proteínica derivada de una chaperona que hace la función de una pareja de fusión.

15 Las chaperonas, conocidas como auxiliares de plegamiento clásicas, son proteínas que asisten en el plegamiento y mantenimiento de la integridad estructural de otras proteínas. Los ejemplos de auxiliares de plegamiento se describen en detalle en el documento WO 03/000877. De acuerdo con la invención, las chaperonas de la clase de la peptidil-prolil-isomerasa, tales como las chaperonas de la familia FKBP, se pueden usar para la fusión con las variantes del antígeno p24 de HTLV. Los ejemplos de chaperonas FKBP adecuadas como parejas de fusión son FkpA, SlyD y SlpA. Otra chaperona adecuada como pareja de fusión para p24 de HTLV es Skp, una chaperona trimérica del periplasma de *E. coli*, que no pertenece a la familia FKBP. No siempre es necesario usar la secuencia completa de una chaperona. También se pueden usar fragmentos funcionales de chaperonas (denominados módulos competentes para la unión) que todavía poseen las capacidades y funciones requeridas (véase el documento WO 98/13496).

25 De acuerdo con un modo de realización adicional de la invención, al menos uno o al menos dos módulos de una chaperona FKBP tal como, por ejemplo, SlyD, SlpA o FkpA de *E. coli* se usan como restos de fusión para la expresión de los antígenos p24 de HTLV. La chaperona Skp se puede usar también como pareja de fusión. La fusión de dos dominios FKBP-chaperona da como resultado una solubilidad mejorada del polipéptido de fusión resultante. Los restos de fusión se pueden ubicar en el extremo N o en el extremo C o en ambos extremos (de tipo sándwich) del antígeno p24 de HTLV.

30 Preferentemente, los antígenos p24 de HTLV de acuerdo con la invención se fusionan a una chaperona oligomérica. Las chaperonas oligoméricas son chaperonas que forman dímeros, trímeros o incluso multímeros superiores de manera natural de forma que se ensambla una pluralidad de subunidades monoméricas mediante interacciones no covalentes específicas. Las chaperonas oligoméricas preferentes son FkpA y Skp.

Particularmente preferente es un antígeno p24 de HTLV soluble fusionado a una chaperona seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 9 a 16 y 18 a 24.

40 Los antígenos p24 de HTLV de acuerdo con la invención se pueden generar y preparar por medio de técnicas de ADN recombinante. Otro aspecto de la divulgación, por lo tanto, es una molécula de ADN recombinante que codifica un antígeno p24 de HTLV y las variantes del mismo como se define anteriormente. El término "molécula de ADN recombinante" se refiere a una molécula que se prepara mediante la combinación de dos segmentos de secuencia de ADN separados de otro modo, conseguida mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de polinucleótidos mediante técnicas de ingeniería genética o mediante síntesis química. Al hacerlo de esta manera, se pueden unir segmentos de polinucleótidos de funciones deseadas para generar una combinación deseada de funciones. Las técnicas de ADN recombinante para la expresión de proteínas en células huésped procariontas o eucariotas inferiores o superiores se conocen bien en la técnica. Se han descrito, por ejemplo, por Sambrook *et al.*, (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual).

50 Las moléculas de ADN recombinante de acuerdo con la divulgación también pueden contener secuencias que codifican péptidos conectores de 10 a 100 residuos de aminoácidos entre el antígeno p24 de HTLV y los restos de fusión y también entre varios restos de fusión. Dicha secuencia conectora puede, por ejemplo, albergar un sitio de escisión proteolítica.

55 Un aspecto adicional de la divulgación es un vector de expresión que comprende una molécula de ADN recombinante unida de forma funcional de acuerdo con la presente invención, es decir, una molécula de ADN recombinante que codifica un antígeno p24 de HTLV y opcionalmente una chaperona de peptidil prolil isomerasa, tal como una chaperona FKBP, en la que la chaperona FKBP se selecciona de FkpA, SlyD y SlpA. En un modo de realización alternativo, la molécula de ADN recombinante codifica una proteína de fusión que comprende un antígeno p24 de HTLV y Skp. El vector de expresión que comprende un ADN recombinante de acuerdo con la presente divulgación se puede usar para expresar el antígeno p24 de HTLV en un sistema de traducción sin células o se puede usar para transformar una célula huésped para la expresión del antígeno p24 de HTLV de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Otro aspecto de la divulgación, por lo tanto, se refiere a una célula huésped transformada con un vector de expresión de acuerdo con la presente invención. En un modo de realización de la presente divulgación, los antígenos

p24 de HTLV recombinante se producen en células de *E. coli*.

Un aspecto adicional es un procedimiento para producir un antígeno p24 de HTLV soluble, estable e inmunorreactivo de acuerdo con la invención. Dicho antígeno p24 se puede producir como una proteína de fusión que contiene el antígeno p24 de HTLV y una chaperona. Preferentemente, se usa una chaperona tal como Skp o una chaperona de la clase de peptidil prolil isomerasa como una chaperona FKBP. En un modo de realización adicional de la invención dicha chaperona FKBP se selecciona del grupo que consiste en SlyD, FkpA y SlpA.

Este procedimiento comprende las etapas de

a) cultivo de células huésped transformadas con el vector de expresión descrito anteriormente que contiene un gen que codifica un antígeno p24 de HTLV

b) expresión del gen que codifica dicho antígeno p24 de HTLV

c) purificación de dicho antígeno p24 de HTLV.

Opcionalmente, como una etapa adicional d), la solubilización funcional se debe llevar a cabo de modo que el antígeno p24 de HTLV se lleve a una conformación soluble e inmunorreactiva por medio de técnicas de repliegamiento conocidas en la técnica.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de anticuerpos anti-HTLV en una muestra humana aislada en el que se usa un antígeno p24 de HTLV de acuerdo con la invención como pareja de unión para los anticuerpos. La invención, por tanto, incluye un procedimiento para la detección de anticuerpos específicos para HTLV en una muestra aislada, comprendiendo dicho procedimiento

a) formar una mezcla de inmunorreacción mezclando una muestra de líquido corporal con un antígeno p24 de HTLV de acuerdo con la invención

b) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un período suficiente para permitir que los anticuerpos contra dicho antígeno p24 de HTLV presentes en la muestra de líquido corporal inmunoreaccionen con dicho antígeno p24 de HTLV para formar un producto de inmunorreacción; y

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

En un aspecto adicional, dicho procedimiento es adecuado para detectar anticuerpos contra HTLV de la subclase de IgG e IgM.

Los inmunoensayos para la detección de anticuerpos se conocen bien en la técnica y, por tanto, son procedimientos para llevar a cabo dichos ensayos y aplicaciones y procedimientos prácticos. Los antígenos p24 de HTLV de acuerdo con la invención se pueden usar para mejorar los ensayos para la detección de anticuerpos anti-HTLV independientemente de los marcadores usados e independientemente del modo de detección (por ejemplo, ensayo de radioisótopos, inmunoensayo enzimático, ensayo de electroquimioluminiscencia, etc.) o del principio del ensayo (por ejemplo, ensayo de tira reactiva, ensayo de tipo sándwich, concepto de prueba indirecta o ensayo homogéneo, etc.). Todos los líquidos biológicos conocidos por el experto se pueden usar como muestras aisladas para la detección de anticuerpos anti-HTLV. Las muestras habitualmente usadas son líquidos corporales como sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina o saliva.

Un modo de realización adicional de la invención es un inmunoensayo para detectar anticuerpos anti-HTLV en una muestra aislada realizado 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, debido a que los dos antígenos forman puente mediante un analito de anticuerpo. En dicho ensayo, se requiere y utiliza la capacidad de un anticuerpo de unir al menos dos moléculas diferentes de un antígeno dado con sus dos (IgG, IgE), cuatro (IgA) o diez (IgM) paratopos.

En más detalle, un inmunoensayo para la determinación de anticuerpos anti-HTLV de acuerdo con el formato de puente de doble antígeno se lleva a cabo incubando una muestra que contiene los anticuerpos anti-HTLV con dos antígenos p24 de HTLV diferentes, es decir, un primer antígeno p24 de HTLV ("fase sólida") y un segundo antígeno p24 de HTLV ("detección"), en el que cada uno de dichos antígenos se une específicamente a dichos anticuerpos anti-HTLV. El primer antígeno se puede unir directa o indirectamente a una fase sólida y habitualmente transporta un grupo efector que es parte de un par de unión bioafín como, por ejemplo, biotina y avidina. Por ejemplo, si el primer antígeno se conjuga con biotina, la fase sólida se recubre ya sea con avidina o estreptavidina. El segundo antígeno transporta un marcador. Por tanto, se forma una mezcla de inmunorreacción que comprende el primer antígeno, el anticuerpo de muestra y el segundo antígeno. Una fase sólida a la que se puede unir el primer antígeno se añade antes de la adición de la muestra a dichos antígenos o después de que se forme la mezcla de inmunorreacción. Esta mezcla de inmunorreacción se mantiene durante un período de tiempo suficiente para permitir que anticuerpos anti-HTLV contra

dichos antígenos p24 de HTLV en la muestra de líquido corporal inmunorreaccionen con dichos antígenos p24 de HTLV 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, se detecta la presencia de cualquiera de dichos productos de inmunorreacción en la fase sólida o líquida o en ambas.

5 En dicho inmunoensayo DAGS, las estructuras básicas del "antígeno de fase sólida" y el "antígeno de detección" son esencialmente las mismas. También es posible usar, en un ensayo de puente de doble antígeno, antígenos p24 de HTLV similares pero diferentes, que son inmunológicamente de reacción cruzada. 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 posible usar diferentes restos de fusión para cada antígeno p24 de HTLV (por ejemplo, SlyD fusionado a p24 de HTLV en el lado de la fase sólida y p24 de FkpA fusionado a p24 de HTLV en el lado de detección) ya que dichas variaciones alivian significativamente el problema de unión no específica y, por tanto, mitigan el riesgo de resultados positivos falsos.

15 Preferentemente, en dicho inmunoensayo DAGS se aplica un formato asimétrico, que combina un p24 de HTLV fusionado a FkpA y un antígeno p24 de HTLV fusionado a Skp. Más preferentemente, el p24 de HTLV fusionado a FkpA se usa en el lado de la fase sólida y el p24 de HTLV fusionado a Skp se aplica en el lado de detección, pero también es posible tener una disposición inversa, es decir, un antígeno p24 de HTLV fusionado a Skp en el lado de la fase sólida y p24 de HTLV fusionado a FkpA en el lado de detección. Más preferentemente, la proteína de fusión FkpA con p24 de HTLV transporta un resto de biotina para la unión a una fase sólida que se ha recubierto con estreptavidina o avidina y la proteína de fusión Skp con p24 de HTLV transporta un marcador electroquimioluminiscente tal como complejos de rutenio. En caso de una disposición inversa, la proteína de fusión de Skp con p24 transporta una biotina y la de FkpA con p24 transporta dicho marcador.

25 Un modo de realización adicional de la presente invención es, por lo tanto, un inmunoensayo de acuerdo con el concepto de puente de doble antígeno en el que se usan un primer antígeno p24 de HTLV de acuerdo con la presente invención, y un segundo antígeno p24 de HTLV de acuerdo con la presente invención.

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

35 Un tema central adicional de la invención es un kit de reactivos para la detección de anticuerpos contra HTLV que contiene, además de los aditivos de prueba habituales para inmunoensayos, al menos un antígeno de los antígenos p24 de HTLV de acuerdo con la invención, adecuado para unirse específicamente a los anticuerpos de HTLV que se van a determinar y que posiblemente transporta un marcador, así como otros aditivos habituales si es necesario.

Un kit de reactivos puede contener un antígeno p24 de HTLV de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO. 9 a 16 y 18 a 24.

40 Además, los kits de reactivos definidos anteriormente contienen controles y soluciones patrón, así como reactivos en una o más soluciones con los aditivos, tampones, sales, detergentes, etc., comunes que se usan por el experto en la técnica junto con las instrucciones de uso.

45 Otro modo de realización es una composición de antígenos de HTLV que comprende un antígeno p24 de HTLV soluble de acuerdo con la presente invención y un antígeno env de HTLV, preferentemente gp21 que comprende SEQ ID NO. 25. El término "composición" se refiere a polipéptidos expresados por separado que están presentes como moléculas distintas individuales en una mezcla. El término composición excluye una proteína que lleva fragmentos de p24 y gp21 en una única cadena polipeptídica.

50 Se divulga una composición que comprende los dominios C-terminales de p24 de HTLV, particularmente una composición que comprende un antígeno p24 de HTLV-I de acuerdo con SEQ ID NO. 3 (que carece de SEQ ID NO. 2) y/o un antígeno p24 de HTLV-II de acuerdo con SEQ ID NO. 7 (que carece de SEQ ID NO. 6) y gp21 de HTLV.

55 Por ejemplo, en dicha composición, puede estar presente una secuencia de gp21 de HTLV que comprende cualquiera de SEQ ID NO. 25, 26 o 27. Para la aplicación en un inmunoensayo de acuerdo con el formato DAGS, la composición comprende cada antígeno de HTLV en dos formas, es decir, en una forma que permite que el antígeno se una a una fase sólida (por ejemplo, un antígeno biotinilado que se puede unir a una superficie recubierta con estreptavidina) y en una forma marcada que permite la detección del inmunocomplejo entre los anticuerpos de HTLV presentes en la muestra y los antígenos de HTLV aplicados.

60 La invención también se refiere al uso de un antígeno p24 de HTLV de acuerdo con la invención en una prueba de diagnóstico *in vitro* para la detección de anticuerpos anti-HTLV.

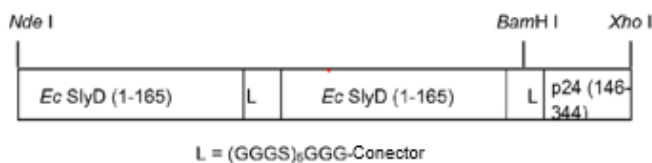
65 En la medida en que los siguientes ejemplos forman parte del tema principal que se encuentra dentro del alcance de las reivindicaciones, se deben ver como ilustrativos de la invención. En cualquier otra circunstancia, estos se deben ver como proporcionados solamente con propósitos de referencia.

Ejemplo 1**Clonación y purificación de polipéptidos de fusión de la cápside p24****Clonación de casetes de expresión**

Sobre la base del plásmido de expresión pET24a de Novagen (Madison, WI, EE. UU.), los casetes de expresión que codifican las proteínas de fusión p24 de HTLV-I y HTLV-II se obtuvieron esencialmente como se describe (Scholz, C. *et al.*, J. Mol. Biol. (2005) 345, 1229-1241). Las secuencias de los antígenos p24 de HTLV-I y HTLV-II se extrajeron de la base de datos SwissProt (n.º de identificación de SwissProt P10274 y P03353, respectivamente). Se adquirió de Medigenomix (Martinsried, Alemania) un gen sintético que codifica los aa 146-344 del antígeno de la cápside p24 (la numeración se refiere al precursor de la poliproteína Gag-Pro) de HTLV-I (que carece de los 15 aminoácidos ricos en prolina en el extremo N de la proteína de la cápside madura) con una región conectora rica en glicina fusionada dentro del marco al extremo N. Los residuos de cisteína de p24 en las posiciones 193, 311 y 332 se cambiaron a residuos de alanina para evitar efectos secundarios indeseables tales como oxidación o puente disulfuro intermolecular. Los sitios de restricción *Bam*HI y *Xho*I estaban en los extremos 5' y 3' de la región codificante de p24, respectivamente. También se adquirió de Medigenomix un gen sintético adicional que codifica dos unidades *Ec*SlyD (residuos 1-165 del n.º de acceso de SwissProt P0A9K9) conectado por medio de una región conectora rica en glicina y que abarca parte de una región conectora adicional en el extremo C. 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 habilitar la fusión dentro del marco de la parte chaperona *Ec*SlyD-*Ec*SlyD y la parte de antígeno p24 por simple ligación. Para evitar procesos de recombinación accidentales y aumentar la estabilidad genética del casete de expresión en la *E. coli* huésped, se degeneraron las secuencias de nucleótidos que codifican las unidades *Ec*SlyD 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.

El vector pET24a se digirió con *Nde*I y *Xho*I y se insertó el casete que comprende SlyD en tándem fusionado dentro del marco a p24 de HTLV-I (146-344). Se construyeron en consecuencia casetes de expresión que comprenden SlyD de *Pasteurella multocida* (1-156, n.º de identificación de SwissProt Q9CKP2), Skp de *E. coli* (21-161, n.º de identificación de SwissProt P0AEU7) o FkpA de *E. coli* (26-270, n.º de identificación de SwissProt P45523), así como casetes de expresión que comprenden p24 y fragmentos de p24 de HTLV-II (n.º de identificación de SwissProt P03353). Como con p24 de HTLV-I, los residuos de cisteína genuinos de p24 de HTLV-II en las posiciones 199, 281, 317 y 338 (nuevamente, la numeración se refiere a la poliproteína Gag-Pro precursora) se cambiaron a residuos de alanina para prevenir efectos secundarios indeseables tales como oxidación o puente disulfuro intermolecular. Todas las variantes polipeptídicas de fusión recombinantes contenían un identificador de hexahistidina C-terminal para facilitar la purificación y el replegamiento asistidos por Ni-NTA. Se usaron técnicas de QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) y de PCR estándar para generar mutaciones puntuales, eliminación, inserción y variantes de extensión o sitios de restricción en los respectivos casetes de expresión.

El dibujo a continuación muestra un esquema del antígeno p24 de HTLV-I truncado de forma N-terminal 146-344 que lleva dos unidades chaperonas SlyD fusionadas dentro del marco a su extremo N-terminal. Para denotar el origen de *E. coli* de la pareja de fusión SlyD, el polipéptido de fusión representado se ha nombrado *Ec*SlyD-*Ec*SlyD-p24 (146-344).



La inserción del plásmido resultante se secuenció y se encontró que codifica la proteína de fusión deseada. Las secuencias de aminoácidos completas de los polipéptidos de fusión p24 de HTLV-I y HTLV-II se muestran en SEQ ID NO. 9 a 16 y 18 a 24. La secuencia de aminoácidos del conector L se muestra en SEQ ID NO. 17.

Purificación de proteínas de fusión que comprenden p24 y variantes de p24 de HTLV-I y HTLV-II

Todas las variantes de proteína de fusión p24 se purificaron usando protocolos prácticamente idénticos. Se cultivaron células BL21 de *E. coli* (DE3) que albergan el plásmido de expresión pET24a particular a 37 °C en medio LB más kanamicina (30 µg/ml) a una DO₆₀₀ de 1,5, y se indujo la sobreexpresión citosólica mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactósido 1 mM. Tres horas después de la inducción, las células se recogieron mediante centrifugación (20 min a 5000 g), se congelaron y se almacenaron a -20 °C. Para la lisis celular, se resuspendió el sedimento congelado en fosfato de sodio 50 mM refrigerado, pH 8,0, GdmCl 7,0 M, imidazol 5 mM y se agitó la suspensión durante 2 h en hielo para completar la lisis celular. Después de la centrifugación y la filtración (0,45 µm/0,2 µm), se aplicó el lisado en bruto

sobre 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 desde 5 a 15 mM de imidazol (en fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0, GdmCl 7,0 M, TCEP 5,0 mM). Se aplicaron al menos 15-15 volúmenes del tampón de lavado. Entonces, se reemplazó la solución de GdmCl 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 proteasas que se copurifican, se incluyó un cóctel inhibidor de proteasa (Complete® sin EDTA, Roche) en el tampón de replegamiento. Se aplicaron un total de 15-20 volúmenes de columna de tampón de replegamiento en una reacción durante la noche. Entonces, tanto el TCEP como el cóctel inhibidor Complete® sin EDTA se eliminaron lavando 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, pH 8,0, KCl 100 mM, se elevó a 20-80 mM (dependiendo de la respectiva proteína diana) para eliminar los contaminantes proteínicos unidos de manera inespecífica. Entonces, se eluyó la proteína natural mediante imidazol 500 mM en el mismo tampón. Las fracciones que contenían proteína se evaluaron en cuanto a su pureza mediante Tricina-SDS-PAGE y se agruparon. Finalmente, se sometieron las proteínas a cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex HiLoad, Amersham Pharmacia) y se agruparon las fracciones que contenían proteína y se concentraron a 10-20 mg/ml en una célula Amicon (YM10).

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

Ejemplo 2

Mediciones espectroscópicas

Las mediciones de concentración de proteína se realizaron con un espectrofotómetro Uvikon XL de doble haz. 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.

Tabla 1: Parámetros de proteína de las variantes del polipéptido de fusión p24 generadas y usadas en el presente estudio. Todos los parámetros se refieren a los respectivos monómeros de proteína.

Proteína de fusión	Longitud de la proteína diana (residuos aa)	Peso molecular del polipéptido de fusión (Da)	pI	ϵ_{M280} M ⁻¹ cm ⁻¹	Abs _{0,1%} (= 1 mg/ml)
variantes de p24					
HTLV-I					
<i>EcSlyD-EcSlyD-p24</i>	146-344	61 762	5,0	35 870	0,581
<i>EcFkpA-p24</i>	146-344	50 840	6,8	39 880	0,784
<i>EcSkp-p24</i>	146-344	40 306	9,1	25 440	0,631
<i>EcSlyD-EcSlyD-p24/CTD</i>	258-344	49 311	4,9	25 900	0,525
<i>EcFkpA-p24/CTD</i>	258-344	38 389	7,1	29 910	0,779
<i>EcSkp-p24/CTD</i>	258-344	27 855	9,3	15 470	0,555
<i>EcSlyD-EcSlyD-p24/NTD</i>	146-260	52 486	4,8	21 890	0,417
<i>EcFkpA-p24/NTD</i>	146-260	41 565	6,5	25 900	0,623
<i>EcSkp-p24/NTD</i>	146-260	31 031	9,0	11 460	0,369
variantes de p24					
HTLV-II					
<i>EcSlyD-EcSlyD-p24</i>	152-350	61 868	5,0	35 870	0,580
<i>EcFkpA-p24</i>	152-350	50 946	7,2	39 880	0,783
<i>EcSkp-p24</i>	152-350	40 412	9,2	25 440	0,630
<i>EcFkpA-p24/CTD</i>	267-350	38 120	7,1	29 910	0,785
<i>EcSkp-p24/CTD</i>	267-350	27 586	9,3	15 470	0,561
<i>EcFkpA-p24/NTD</i>	152-266	41 739	6,7	25 900	0,621
<i>EcSkp-p24/CTD</i>	152-266	31 205	9,2	11 460	0,367

Las secuencias de aminoácidos de las variantes del polipéptido de fusión se muestran en SEQ ID NO. 9 a 16 y 18 a 24.

Ejemplo 3

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

Los grupos ϵ -amino de lisina de los polipéptidos de fusión se modificaron a concentraciones de proteína de 10-30 mg/ml con moléculas marcadoras de biotina y rutenio activadas con N-hidroxi-succinimida, respectivamente. La proporción marcador/proteína varió desde 2:1 a 5:1 (mol:mol), dependiendo de la respectiva proteína de fusión. El tampón de reacción era fosfato de potasio 150 mM, pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 min y se detuvo añadiendo L-lisina tamponada hasta una concentración final de 10 mM. Para evitar la inactivación hidrolítica de los marcadores, se prepararon las respectivas soluciones madre en DMSO seco (calidad seccosolv, Merck, Alemania). Las concentraciones de DMSO de hasta un 25 % en el tampón de reacción se toleraron bien por todas las proteínas de fusión estudiadas. Después de la reacción de acoplamiento, se eliminó el marcador libre sin reaccionar haciendo pasar el conjugado de proteína en bruto sobre una columna de filtración en gel (Superdex 200 HiLoad).

Ejemplo 4

Reactividad inmunológica (es decir, antigenicidad) de diferentes variantes del antígeno de la cápside p24 en un inmunoensayo de HTLV

Se evaluó la reactividad inmunológica (antigenicidad) de las variantes de fusión de polipéptido del antígeno de la cápside p24 de HTLV en analizadores automatizados Elecsys® 2010 y cobas e 411 (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 señal en Elecsys® 2010 y cobas e 411 se basa en electroquimioluminiscencia. El conjugado de biotina (es decir, el antígeno de captura) se inmoviliza sobre la superficie de una microesfera magnética recubierta con estreptavidina mientras que el antígeno de detección lleva un catión de rutenio en complejo (que se intercambia entre los estados de oxidorreducción 2+ y 3+) como resto de señalización. En presencia de un analito de inmunoglobulina específico, el complejo de rutenio cromógeno forma un puente a la fase sólida y emite luz a 620 nm después de la excitación en un electrodo de platino. La señal producida está en unidades relativas de luz.

Se evaluaron los polipéptidos de fusión del antígeno de la cápside p24 recombinante en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich de doble antígeno (DAGS). Con este fin, se usó el antígeno de la cápside p24 de HTLV-I recombinante como conjugado de biotina y rutenio, respectivamente, para detectar anticuerpos anti-p24 en sueros humanos.

El p24 es uno de los antígenos inmunodominantes de HTLV, y las variantes solubles de p24, como se divulga en esta solicitud de patente, son recursos inapreciables para la detección de infecciones por HTLV. En todas las mediciones, se implementaron *EcSlyD-EcSlyD*, *EcFkpA* y *EcSkp* químicamente polimerizados y no marcados en un gran exceso (~ 10 μ g/ml) en el tampón de reacción como sustancias de antiinterferencia para evitar reacciones cruzadas inmunológicas por medio de las unidades de fusión de chaperona.

En particular, se examinaron tres variantes de p24 de HTLV-I en el presente estudio, concretamente p24 de longitud completa (146-344, la numeración se refiere al precursor de poliproteína Gag-Pro, véanse SEQ ID NO. 1 y 5), dominio N-terminal de p24 (p24/NTD, 146-260) y dominio C-terminal de p24 (p24/CTD, 261-344). Para detectar moléculas de IgG anti-p24, se usaron *EcSlyD-EcSlyD*-p24-biotina y *EcSlyD-EcSlyD*-p24-rutenio en R1 (tampón reactivo 1) y R2 (tampón reactivo 2), respectivamente. Para detectar ambas moléculas de IgM e IgG anti-p24, se usaron *EcFkpA*-p24-biotina y *EcSkp*-p24-rutenio en R1 (tampón reactivo 1) y R2 (tampón reactivo 2), respectivamente. Las concentraciones de los conjugados de antígeno en R1 y R2, respectivamente, fueron de 100 ng/ml cada una. Se usó p24 maduro truncado de forma N-terminal (146-344) como un polipéptido de fusión *EcSlyD-EcSlyD* en el lado de biotina y como un polipéptido de fusión *FkpAEc* en el lado de rutenio.

Desafortunadamente, los paneles de seroconversión de HTLV humanos, que son un recurso indispensable para la obtención de ensayos de diagnóstico *in vitro* mejorados, no están disponibles comercialmente. Para evaluar las propiedades antigénicas de las diferentes variantes de p24 en la fase muy temprana de la infección por HTLV, se tuvo que recurrir a sueros de conejo que sirven como modelo de seroconversión. Con este fin, se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda con lisados víricos de HTLV-I y -II purificados e inactivados (adquiridos en Zeptomatrix, Nueva York, EE. UU.) y adyuvante completo de Freund para inducir una respuesta inmunitaria (2 inmunizaciones, intervalo de 1 semana). Los autores de la presente invención son conscientes de que el patrón de la respuesta inmunitaria humoral sobre las verdaderas infecciones por HTLV en el hombre podría diferir ligeramente de una respuesta inmunitaria desencadenada por la vacunación con lisado vírico de conejos. No obstante, la seroconversión de conejo inducida artificialmente es la mejor imitación que se tenía disponible.

En un primer experimento, se evaluó el CTD de p24 monomérico (p24, 261-344) sin suero humano anti-HTLV en la configuración de inmunoensayo DAGS anteriormente mencionada para tener una idea de la señal de fondo. La señal inherente al sistema inevitable es de alrededor de 500 recuentos. Las señales de fondo bajas son indicativas de propiedades fisicoquímicas de alta solubilidad y, en general, benignas de los respectivos conjugados de rutenio. De la tabla 2 se puede inferir que las propiedades fisicoquímicas de CTD de p24 monomérico son excelentes (columna 1). Esto también es válido para CTD de p24 oligomérico (columna 2): FkpA-p24(261-344)-biotina y Skp-p24(261-344)-rutenio, cuando se usan como un par antigénico en el formato DAGS, dan lugar a un fondo de señal de ~ 1100 recuentos con sueros humanos negativos, lo que indica claramente buenas propiedades de solubilidad. Sin embargo, a primera vista se hace evidente que la forma monomérica y oligomérica de CTD de p24 difiere fuertemente en su capacidad de detectar anticuerpos anti-HTLV (y especialmente moléculas de IgM) en paneles de seroconversión como se muestra en la tabla 2. Observando más de cerca la seroconversión K5645, se encontró que el CTD de p24 monomérico apenas se detecta el día 18 como positivo (1558 recuentos), mientras que el uso del CTD de p24 oligomérico ya se revela el día 14 como claramente positivo (8232 recuentos) y da lugar a una señal tan alta como 50 118 recuentos en el día 18. Se ve la misma imagen con los paneles de seroconversión K5646, K5647 y K5648: la variante de CTD de p24 oligomérico produce señales más altas en tiempos más tempranos y, por tanto, garantiza una excelente sensibilidad en la detección temprana de anticuerpos anti-p24 en seroconversiones. En principio, la situación es similar con el dominio N-terminal (NTD) de p24, que abarca los residuos de aminoácidos 146-260 (la numeración se refiere al precursor de poliproteína Gag-Pro). Como con el CTD, la forma oligomérica de NTD de p24 es más adecuada para detectar anticuerpos que aparecen en la fase temprana de la seroconversión (es decir, inmunoglobulinas del tipo M), que se ejemplifica en particular con los paneles de seroconversión K5647 y K5648 (tabla 2, columnas 3 y 4). Sin embargo, las señales de fondo del NTD de p24 oligomérico aumentan significativamente cuando se comparan con CTD de p24. Asimismo, la antigenicidad del dominio C-terminal de p24 parece sobrepasar la antigenicidad del dominio N-terminal. En conclusión, el dominio C-terminal oligomérico de p24 posee propiedades fisicoquímicas destacadas y antigénicas superiores que lo hacen un candidato atractivo para la serología de HTLV. Es claramente superior a p24 de longitud completa (146-344, numeración del precursor de poliproteína Gag-pro) en términos de sensibilidad en la detección temprana de IgM. Como el polipéptido de fusión con Skp de p24 de longitud completa (146-344) no estaba disponible, ya que tendía a agregarse significativamente, los autores de la presente invención estaban limitados a los polipéptidos de fusión con SlyD-SlyD y FkpA de la versión de longitud completa de p24. Cuando se usa SlyD-SlyD-p24 monomérico (146-344) en el lado de biotina y se usa FkpA-p24 oligomérico (146-344) en el lado de rutenio del formato DAGS, los resultados son bastante claros: p24 de longitud completa produce señales excelentes en las últimas fases de los paneles de seroconversión, pero falla completamente en la detección temprana (tabla 2, columna 5). Tanto el CTD de p24 como el NTD de p24 oligoméricos son superiores a la variante monomérica de longitud completa, proporcionando buena evidencia de que la detección temprana sensible depende principalmente de la densidad del epítipo de los fragmentos de p24 usados. No parece ser obligatorio ofrecer la secuencia de p24 completa como un todo para obtener una excelente sensibilidad a la seroconversión. Por el contrario, los epítopos en el dominio N y C de p24 son suficientes para garantizar una detección sensible y fiable de moléculas de IgM en la fase temprana de infección por HTLV, siempre que estos epítopos se ofrezcan en una forma oligomérica. En virtud de su solubilidad superior (como se refleja en las bajas señales de fondo) y su destacada antigenicidad, el dominio C-terminal de p24 de HTLV-I es prometedor como un ingrediente inapreciable en un inmunoensayo de HTLV. Esto fue algo inesperado: como el dominio C del antígeno de la cápside p24 está probablemente implicado en la oligomerización de p24 (Khorasanizadeh *et al.*, J. Mol. Biol. (1999) 291, 491-505), los autores de la presente invención dedujeron que el dominio C aislado posiblemente podría tender a la agregación, al menos debería ser más difícil de manejar que el dominio N. Por otro lado, la expectativa de los autores de la presente invención era que el dominio C de p24 que está oculto en gran medida en las partículas de la cápside madura probablemente albergaría menos epítopos inmunodominantes que el dominio N bien accesible. Para la sorpresa de los autores de la presente invención, es cierto lo contrario. De hecho, el dominio N de p24 también es muy adecuado como un antígeno para el inmunoensayo de HTLV, aunque parece inferior al dominio C-terminal en términos de solubilidad y antigenicidad. La tabla 2 muestra los resultados para las variantes de p24 de HTLV-I. Los autores de la presente invención encontraron resultados prácticamente idénticos para las correspondientes variantes de p24 de HTLV-II. Esto está en línea con las expectativas de los autores de la presente invención ya que las secuencias de aminoácidos de p24 de HTLV-I y HTLV-II comparten un 84 % de identidad y un 93 % de homología. Las secuencias correspondientes para p24 de HTLV-II fueron 152-266 (dominio N, NTD), 267-350 (dominio C, CTD) y 152-350 (p24 de longitud completa maduro), véase también SEQ ID NO. 5-8.

Tabla 2: inmunorreactividad superior de variantes de p24 oligomérico en infecciones tempranas por HTLV (sensibilidad aumentada en paneles de seroconversión de conejos).

Variante de p24 (longitud de fragmento)	CTD mono. (261-344)	CTD oligo. (261-344)	NTD mono. (146-260)	NTD oligo. (146-260)	p24 de longitud completa (146-344)
Pareja de fusión R1 (Bi)	SlyD-SlyD	FkpA	SlyD-SlyD	FkpA	SlyD-SlyD
Pareja de fusión R2 (Ru)	SlyD-SlyD	Skp	SlyD-SlyD	Skp	FkpA
Conc. (ng/ml)	100	100	100	100	300

Recuentos en el analizador Elecsys (cobas e 411)					
Suero sin anti-HTLV					
0701.1201.01	599	976	667	2846	1677
0701.1202.01	611	1116	724	4331	1981
0701.1203.01	592	1148	717	4860	1933
Paneles de seroconversión (día de extracción de sangre)					
K5645 (día 0)	725	1037	790	2330	1608
K5645 (día 10)	612	1196	758	2549	1613
K5645 (día 14)	642	8232	729	2690	2910
K5645 (día 18)	1558	50 118	906	3071	15 191
K5646 (día 0)	592	1045	728	2359	1580
K5646 (día 11)	636	1396	770	2779	1665
K5646 (día 15)	1425	13 090	740	3084	1715
K5646 (día 19)	14 080	106 376	4342	6321	8832
K5646 (día 23)	109 285	160 403	33 361	15 881	76 212
K5647 (día 0)	814	917	799	2295	1445
K5647 (día 12)	2620	95 130	1100	19 920	3606
K5647 (día 16)	159 796	61 639	19 774	88 453	339 050
K5647 (día 20)	187 997	63 193	62 381	99 227	623 586
K5648 (día 0)	572	848	737	2113	1467
K5648 (día 10)	803	1003	871	2562	1512
K5648 (día 14)	2575	122 993	972	4324	2733
K5648 (día 18)	10 107	181 988	4401	21 689	10 892
K5648 (día 22)	58 656	352 195	7844	16 692	48 125

Ejemplo 5

Combinaciones de proteínas transportadoras de chaperonas oligoméricas en un formato de tipo sándwich de doble antígeno asimétrico

5

10

15

20

Se realizó el inmunoensayo esencialmente como se describe en el ejemplo 4. Se pueden usar ventajosamente chaperonas oligoméricas tales como FkpA y Skp como parejas de fusión para lograr una oligomerización funcional de sus respectivos antígenos clientes. La fusión de FkpA o Skp a proteínas diana (es decir, sus antígenos clientes o huéspedes) puede producir polipéptidos de fusión oligoméricos bien definidos que son adecuados para la detección de moléculas de IgM en inmunoensayos. En este caso, los autores de la presente invención abordaron la cuestión de si existe una combinación particularmente preferente de los polipéptidos de fusión Skp-X y FkpA-X cuando se usan en un formato DAGS (de tipo sándwich de doble antígeno). (Nota: "X" se refiere en general a cualquier proteína o antígeno diana). En otras palabras, los autores de la presente invención abordaron la cuestión de si es aconsejable usar polipéptidos de fusión FkpA-X en el lado de biotina (captura) en lugar de en el lado de rutenio (señalización). Por el contrario, los autores de la presente invención se preguntaron si es aconsejable usar los polipéptidos de fusión Skp-X en el lado de rutenio (señalización) en lugar de en el lado de biotina (captura).

En un primer experimento, se prepararon conjugados de biotina y rutenio de *EcSkp* y *EcFkpA* recombinantes purificados como se describe en el ejemplo 3. Es decir, las chaperonas purificadas (es decir, las chaperonas desnudas sin ninguna secuencia diana fusionada) se biotinilaron por medio de un marcador de biotina activado por N-hidroxisuccinimida. Asimismo, se produjeron chaperonas rutiniladas (es decir, las chaperonas desnudas sin ninguna secuencia diana fusionada) por medio de un marcador de rutenio activado por N-hidroxisuccinimida.

Entonces, se realizó un DAGS simétrico con *EcSkp* tanto en el lado de biotina como de rutenio a concentraciones variables. Como muestra, se usó un grupo de sueros humanos sin anti-HTLV, y se llevaron a cabo las mediciones por duplicado. Es obvio a partir de los datos de la tabla 3, que la señal de fondo es bastante alta cuando se usa la misma chaperona oligomérica (en este caso: *EcSkp*) tanto en el lado de biotina como de rutenio de un formato DAGS, incluso en concentraciones muy bajas. La señal de fondo aumenta fuertemente con la concentración de conjugado de una manera dependiente de la dosis. Por tanto, un formato DAGS simétrico no parece ser una opción viable cuando se usa una pareja de fusión oligomérica tal como la chaperona trimérica *Skp* de *E. coli*. Se han encontrado resultados similares para la chaperona dimérica *FkpA*.

Tabla 3: Uso de la misma chaperona oligomérica en ambos lados de un inmunoensayo DAGS (proteína transportadora oligomérica en formato DAGS simétrico)

Experimento	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Tampón a base de R1	R1					
Conc. de Skp-Bi [ng/ml]	10	20	50	100	250	500
Tampón a base de R2	R2					
Conc. de Skp-Ru [ng/ml]	10	20	50	100	250	500
Muestra	Señal (recuentos)	Señal (recuentos)	Señal (recuentos)	Señal (recuentos)	Señal (recuentos)	Señal (recuentos)
Control 1 (grupo de sueros humanos sin anti-HTLV)	3969	6301	12 582	17 521	21 471	21 498
	3921	6170	13 187	17 610	21 467	22 056

Sin embargo, cuando se combinó *EcSkp* y *EcFkpA* en un formato DAGS asimétrico, la imagen resultó completamente diferente (véase la tabla 4 a continuación). Independientemente de la combinación de las chaperonas, las señales de fondo se redujeron sustancialmente cuando se usaron chaperonas diferentes en el lado de captura y de señalización. Por ejemplo, la señal de fondo en el formato DAGS simétrico (es decir, *Skp-Bi/Skp-Ru*) fue de alrededor de 21 000 recuentos a una concentración de conjugado de 250 ng/ml cada una. A la misma concentración de conjugado, la señal de fondo en el formato DAGS asimétrico se reduce drásticamente a 2700 recuentos (*Skp-Bi/FkpA-Ru*) y a 860 recuentos (*FkpA-Bi/Skp-Ru*), respectivamente. A primera vista, es evidente que existe, de hecho, una combinación preferente de *FkpA* y *Skp* en un inmunoensayo DAGS: es aconsejable usar *FkpA* como un conjugado de biotina y *Skp* como un conjugado de rutenio en un inmunoensayo DAGS, y es razonable concluir que lo mismo es válido para los polipéptidos de fusión *FkpA-X* y *Skp-X*.

Tabla 4: Uso de diferentes chaperonas oligoméricas en ambos lados de un inmunoensayo DAGS (proteínas transportadoras oligoméricas en formato DAGS asimétrico)

Variante	V1	V2	V3	V4
Tampón a base de R1	R1			
R1	<i>Skp-Bi</i>	<i>Skp-Bi</i>	<i>FkpA-Bi</i>	<i>FkpA-Bi</i>
Conc. [ng/ml]	10	250	10	250
Tampón a base de R2	R2			
R2	<i>FkpA-Ru</i>	<i>FkpA-Ru</i>	<i>Skp-Ru</i>	<i>Skp-Ru</i>
Conc. [ng/ml]	10	250	10	250
Muestra	Señal (recuentos)	Señal (recuentos)	Señal (recuentos)	Señal (recuentos)
Control 1 (grupo de sueros humanos sin anti-HTLV)	567	2668	447	854

	561	2764	439	864
--	-----	------	-----	-----

Ejemplo 6

Desplegamiento inducido térmicamente detectado por CD de Skp-p24/CTD (267-350) y FkpA-p24/CTD (267-350)

5 Los espectros de CD UV cercano se registraron con un espectropolarímetro Jasco-720 con un soporte de cubeta termorregulado y se convirtieron en elipticidad de residuo media. El tampón era fosfato de potasio 150 mM, pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM. La longitud de trayectoria era de 0,2 cm, la concentración de proteína era de 218 μ M (que se refiere al monómero Skp-p24) o de 147,5 μ M (que se refiere al monómero FkpA-p24). El intervalo de medición era de 250-330 nm, el ancho de banda era de 1,0 nm, la velocidad de exploración era de 20 nm/min a una resolución de 0,5 nm y la respuesta era de 1 s. Para mejorar la proporción de señal a ruido, se midieron los espectros nueve veces y se promediaron.

15 La espectroscopia 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 (250-330 nm) informa sobre contactos terciarios dentro de una proteína (es decir, la estructura globular de una proteína plegada de forma normal) y se considera como la región de característica de un pliegue (conformación) de tipo natural.

20 Los espectros de CD UV cercano de Skp-p24/CTD(267-350) y FkpA-p24/CTD(267-350), SEQ ID NO. 22 y 21, respectivamente, se controlaron para abordar la cuestión de si las proteínas de fusión adoptan una conformación ordenada después del procedimiento de replegamiento acoplado a la matriz que es la etapa crítica en el procedimiento de purificación. La respuesta es bastante clara: las señales de CD UV cercano tanto de Skp-p24/CTD (véase la figura 1) como de FkpA-p24/CTD (véase la figura 3) informan inequívocamente de una estructura terciaria ordenada del respectivo polipéptido de fusión. Obviamente, los residuos aromáticos de Skp-p24/CTD y FkpA-p24/CTD están incrustados en el núcleo de proteína lipófila y experimentan, por tanto, entornos asimétricos que indican fuertemente una conformación de tipo natural del componente de la proteína transportadora y diana dentro de la respectiva construcción de fusión. El espectro de CD UV cercano de Skp-p24/CTD exhibe una señal negativa con máximos a 282 y 277 nm (figura 1). El espectro de CD UV cercano de FkpA-p24/CTD exhibe una señal positiva con un máximo a 280 nm (figura 3).

35 Para abordar la cuestión de si el despliegamiento inducido térmicamente de Skp-p24/CTD y FkpA-p24/CTD es reversible, se controlaron las curvas de fusión en la región de UV cercano en longitudes de onda de detección de 277 y 280 nm, respectivamente. El intervalo de temperatura era de 20-75 °C, el ancho de banda era de 2,0 nm, la pendiente de la temperatura era de 1 °C/min y la respuesta era de 2 s.

El despliegamiento inducido térmicamente se controló a 277 y 280 nm, correspondiente a las amplitudes de señal máxima para Skp-p24/CTD y FkpA-p24/CTD, respectivamente. Tras el calentamiento, los contactos no covalentes que estabilizan la conformación natural de las moléculas del polipéptido de fusión se sueltan y finalmente se descomponen. Para Skp-p24/CTD, este despliegamiento inducido térmicamente (que se controló a 277 nm) se refleja en un aumento en la señal de CD como se muestra en la figura 2. El Skp-p24/CTD obviamente retiene su pliegue de tipo natural y su estructura trimérica hasta 55 °C. El inicio del despliegamiento es entre 55 °C y 60 °C. A 70 °C, la molécula está completamente desplegada, a juzgar por la curva de fusión en la figura 2. De modo impresionante, la señal de CD se restaura cuando la solución de proteína se enfría hasta 20 °C (figuras 1, 2). No obstante, la histéresis de la curva de replegamiento es pronunciada y probablemente indica diferentes vías de despliegamiento y replegamiento. Es asombroso que el despliegamiento inducido térmicamente de una proteína de fusión trimérica compleja tal como Skp-p24/CTD sea, al menos parcialmente, un proceso reversible. Se hubiera esperado que Skp-p24/CTD, después del despliegamiento inducido térmicamente y la disociación en subunidades monoméricas, se agregara muy rápida y cuantitativamente a una temperatura elevada tal como 75 °C. Sin embargo, se encontró que Skp-p24/CTD es obviamente capaz de volver a adoptar su conformación de tipo natural cuando la solución de proteína se enfría hasta 20 °C. De hecho, los espectros de CD UV cercano controlados antes y después del despliegamiento inducido térmicamente prácticamente se superponen (véase la figura 1). En conclusión, Skp-p24/CTD posee sólidas propiedades de plegamiento que son destacadas para una molécula con este grado de complejidad y que son altamente deseadas para un antígeno que se usa en un inmunoensayo. Se encontraron resultados muy similares para FkpA-p24/CTD: al igual que Skp-p24/CTD, FkpA-p24/CTD exhibe una marcada señal de CD en la región UV cercano (250-330 nm, señal máxima a 280 nm), indicando una conformación bien ordenada después del proceso de replegamiento acoplado a la matriz (figura 3). La señal de CD de FkpA-p24/CTD disminuye fuertemente cuando la molécula se despliega y pierde su estructura terciaria (figura 4). Por medio de transiciones térmicas se observó que FkpA-p24/CTD retiene, de hecho, su conformación de tipo natural a temperaturas de hasta 55 °C. El inicio del despliegamiento, que se controla mediante espectroscopia de CD UV cercano a 280 nm, es de alrededor de 60 °C, y a 70 °C, FkpA-p24/CTD está completamente desplegada. Es notable que la señal de CD de la molécula FkpA-p24/CTD natural se restaura completamente después de un ciclo de despliegamiento/replegamiento térmico (figura 4). Como se ilustra en la figura 3, los espectros de CD de FkpA-p24/CTD antes y después del ciclo de despliegamiento/replegamiento se superponen casi perfectamente.

En conclusión, Skp-p24/CTD y FkpA-p24/CTD poseen propiedades de plegamiento muy sólidas que son destacadas para moléculas con este grado de complejidad y que son altamente deseables para polipéptidos de fusión que sirven como ingredientes antigénicos, es decir, especificadores en un inmunoensayo.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

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

5 <120> Variantes solubles e inmunorreactivas del antígeno p24 de la cápside de HTLV

<130> Documento P32015 WO-IR

<160> 27

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 199

15

<212> PRT

<213> Virus linfótrofo de linfocitos T humanos de tipo 1

<400> 1

Gln Met Lys Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu Val Ser Gln Ala Ala
1 5 10 15

Pro Gly Ser Pro Gln Phe Met Gln Thr Ile Arg Leu Ala Val Gln Gln
20 25 30

Phe Asp Pro Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Cys
35 40 45

Ser Ser Leu Val Ala Ser Leu His His Gln Gln Leu Asp Ser Leu Ile
50 55 60

Ser Glu Ala Glu Thr Arg Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Pro Leu Ala Gly
65 70 75 80

Pro Leu Arg Val Gln Ala Asn Asn Pro Gln Gln Gln Gly Leu Arg Arg
85 90 95

Glu Tyr Gln Gln Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ala Ala Leu Pro Gly Ser
100 105 110

Ala Lys Asp Pro Ser Trp Ala Ser Ile Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro
115 120 125

Tyr His Ala Phe Val Glu Arg Leu Asn Ile Ala Leu Asp Asn Gly Leu
130 135 140

Pro Glu Gly Thr Pro Lys Asp Pro Ile Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser
145 150 155 160

20

Asn Ala Asn Lys Glu Cys Gln Lys Leu Leu Gln Ala Arg Gly His Thr
165 170 175

Asn Ser Pro Leu Gly Asp Met Leu Arg Ala Cys Gln Thr Trp Thr Pro
180 185 190

Lys Asp Lys Thr Lys Val Leu
195

<210> 2

ES 2 662 611 T3

<211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> como la secuencia natural pero X = C o A o S

<220>
 <221> MISC_FEATURE

10 <223> Xaa = Cys o Ala o Ser

<400> 2

```

Gln Met Lys Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu Val Ser Gln Ala Ala
1          5          10          15

Pro Gly Ser Pro Gln Phe Met Gln Thr Ile Arg Leu Ala Val Gln Gln
          20          25          30

Phe Asp Pro Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Xaa
          35          40          45

Ser Ser Leu Val Ala Ser Leu His His Gln Gln Leu Asp Ser Leu Ile
          50          55          60

Ser Glu Ala Glu Thr Arg Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Pro Leu Ala Gly
          65          70          75          80

Pro Leu Arg Val Gln Ala Asn Asn Pro Gln Gln Gln Gly Leu Arg Arg
          85          90          95

Glu Tyr Gln Gln Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ala Ala Leu Pro Gly Ser
          100          105          110
  
```

Ala Lys Asp
 115

15 <210> 3
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> como la secuencia natural pero X = A o C o S

<220>
 <221> MISC_FEATURE

25 <223> Xaa = Cys o Ala o Ser

<400> 3

ES 2 662 611 T3

Pro Ser Trp Ala Ser Ile Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro Tyr His Ala
1 5 10 15

Phe Val Glu Arg Leu Asn Ile Ala Leu Asp Asn Gly Leu Pro Glu Gly
20 25 30

Thr Pro Lys Asp Pro Ile Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser Asn Ala Asn
35 40 45

Lys Glu Xaa Gln Lys Leu Leu Gln Ala Arg Gly His Thr Asn Ser Pro
50 55 60

Leu Gly Asp Met Leu Arg Ala Xaa Gln Thr Trp Thr Pro Lys Asp Lys
65 70 75 80

Thr Lys Val Leu

<210> 4
<211> 199
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> como la secuencia natural pero X = C o A o S

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Xaa = Cys o Ala o Ser

15 <220>
<400> 4

Gln Met Lys Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu Val Ser Gln Ala Ala
1 5 10 15

Pro Gly Ser Pro Gln Phe Met Gln Thr Ile Arg Leu Ala Val Gln Gln
20 25 30

Phe Asp Pro Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Xaa
35 40 45

Ser Ser Leu Val Ala Ser Leu His His Gln Gln Leu Asp Ser Leu Ile

20

ES 2 662 611 T3

50

55

60

Ser Glu Ala Glu Thr Arg Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Pro Leu Ala Gly
65 70 75 80

Pro Leu Arg Val Gln Ala Asn Asn Pro Gln Gln Gln Gly Leu Arg Arg
85 90 95

Glu Tyr Gln Gln Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ala Ala Leu Pro Gly Ser
100 105 110

Ala Lys Asp Pro Ser Trp Ala Ser Ile Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro
115 120 125

Tyr His Ala Phe Val Glu Arg Leu Asn Ile Ala Leu Asp Asn Gly Leu
130 135 140

Pro Glu Gly Thr Pro Lys Asp Pro Ile Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser
145 150 155 160

Asn Ala Asn Lys Glu Xaa Gln Lys Leu Leu Gln Ala Arg Gly His Thr
165 170 175

Asn Ser Pro Leu Gly Asp Met Leu Arg Ala Xaa Gln Thr Trp Thr Pro
180 185 190

Lys Asp Lys Thr Lys Val Leu
195

<210> 5

<211> 199

5 <212> PRT

<213> Virus linfótopo de linfocitos T humanos de tipo 2

<400> 5

Gln Met Lys Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu Val Ser Ser Ser Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ser Pro Gln Phe Met Gln Thr Leu Arg Leu Ala Val Gln Gln
20 25 30

Phe Asp Pro Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Cys
35 40 45

Ser Ser Leu Val Val Ser Leu His His Gln Gln Leu Asn Thr Leu Ile
50 55 60

10 Thr Glu Ala Glu Thr Arg Gly Met Thr Gly Tyr Asn Pro Met Ala Gly

ES 2 662 611 T3

Ser Ser Leu Val Val Ser Leu His His Gln Gln Leu Asn Thr Leu Ile
50 55 60

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

Pro Leu Arg Met Gln Ala Asn Asn Pro Ala Gln Gln Gly Leu Arg Arg
85 90 95

Glu Tyr Gln Asn Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ser Thr Leu Pro Gly Asn
100 105 110

Thr Arg Asp
115

5 <210> 7
<211> 84
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> como la secuencia natural pero X = C o A o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Xaa = Cys o Ala o Ser

15 <400> 7

Pro Ser Trp Ala Ala Ile Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro Tyr Xaa Ala
1 5 10 15

Phe Val Glu Arg Leu Asn Val Ala Leu Asp Asn Gly Leu Pro Glu Gly
20 25 30

Thr Pro Lys Glu Pro Ile Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser Asn Ala Asn
35 40 45

Lys Glu Xaa Gln Lys Ile Leu Gln Ala Arg Gly His Thr Asn Ser Pro
50 55 60

Leu Gly Glu Met Leu Arg Thr Xaa Gln Ala Trp Thr Pro Lys Asp Lys
65 70 75 80

Thr Lys Val Leu

20 <210> 8
<211> 199
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> como la secuencia natural pero X = C o A o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Xaa = Cys o Ala o Ser

30 <400> 8

ES 2 662 611 T3

Gln Met Lys Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu Val Ser Ser Ser Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ser Pro Gln Phe Met Gln Thr Leu Arg Leu Ala Val Gln Gln
20 25 30

Phe Asp Pro Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Xaa
35 40 45

Ser Ser Leu Val Val Ser Leu His His Gln Gln Leu Asn Thr Leu Ile
50 55 60

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

Pro Leu Arg Met Gln Ala Asn Asn Pro Ala Gln Gln Gly Leu Arg Arg
85 90 95

Glu Tyr Gln Asn Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ser Thr Leu Pro Gly Asn
100 105 110

Thr Arg Asp Pro Ser Trp Ala Ala Ile Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro
115 120 125

Tyr Xaa Ala Phe Val Glu Arg Leu Asn Val Ala Leu Asp Asn Gly Leu
130 135 140

Pro Glu Gly Thr Pro Lys Glu Pro Ile Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser
145 150 155 160

Asn Ala Asn Lys Glu Xaa Gln Lys Ile Leu Gln Ala Arg Gly His Thr
165 170 175

Asn Ser Pro Leu Gly Glu Met Leu Arg Thr Xaa Gln Ala Trp Thr Pro
180 185 190

Lys Asp Lys Thr Lys Val Leu
195

<210> 9
<211> 582
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Proteína de fusión

10 <400> 9

ES 2 662 611 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
 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

ES 2 662 611 T3

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 Gln Met Lys Asp Leu Gln Ala Ile Lys
 370 375 380
 Gln Glu Val Ser Gln Ala Ala Pro Gly Ser Pro Gln Phe Met Gln Thr
 385 390 395 400
 Ile Arg Leu Ala Val Gln Gln Phe Asp Pro Thr Ala Lys Asp Leu Gln
 405 410 415
 Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Val Ala Ser Leu His His
 420 425 430
 Gln Gln Leu Asp Ser Leu Ile Ser Glu Ala Glu Thr Arg Gly Ile Thr
 435 440 445
 Gly Tyr Asn Pro Leu Ala Gly Pro Leu Arg Val Gln Ala Asn Asn Pro
 450 455 460

ES 2 662 611 T3

Gln Gln Gln Gly Leu Arg Arg Glu Tyr Gln Gln Leu Trp Leu Ala Ala
465 470 475 480

Phe Ala Ala Leu Pro Gly Ser Ala Lys Asp Pro Ser Trp Ala Ser Ile
485 490 495

Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro Tyr His Ala Phe Val Glu Arg Leu Asn
500 505 510

Ile Ala Leu Asp Asn Gly Leu Pro Glu Gly Thr Pro Lys Asp Pro Ile
515 520 525

Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser Asn Ala Asn Lys Glu Ala Gln Lys Leu
530 535 540

Leu Gln Ala Arg Gly His Thr Asn Ser Pro Leu Gly Asp Met Leu Arg
545 550 555 560

Ala Ala Gln Thr Trp Thr Pro Lys Asp Lys Thr Lys Val Leu Leu Glu
565 570 575

His His His His His His
580

<210> 10
<211> 476
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Proteína de fusión

<400> 10

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

ES 2 662 611 T3

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
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Met Lys
 260 265 270
 Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu Val Ser Gln Ala Ala Pro Gly Ser
 275 280 285
 Pro Gln Phe Met Gln Thr Ile Arg Leu Ala Val Gln Gln Phe Asp Pro
 290 295 300
 Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Ala Ser Ser Leu
 305 310 315 320
 Val Ala Ser Leu His His Gln Gln Leu Asp Ser Leu Ile Ser Glu Ala
 325 330 335

ES 2 662 611 T3

Glu Thr Arg Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Pro Leu Ala Gly Pro Leu Arg
 340 345 350

Val Gln Ala Asn Asn Pro Gln Gln Gln Gly Leu Arg Arg Glu Tyr Gln
 355 360 365

Gln Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ala Ala Leu Pro Gly Ser Ala Lys Asp
 370 375 380

Pro Ser Trp Ala Ser Ile Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro Tyr His Ala
 385 390 395 400

Phe Val Glu Arg Leu Asn Ile Ala Leu Asp Asn Gly Leu Pro Glu Gly
 405 410 415

Thr Pro Lys Asp Pro Ile Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser Asn Ala Asn
 420 425 430

Lys Glu Ala Gln Lys Leu Leu Gln Ala Arg Gly His Thr Asn Ser Pro
 435 440 445

Leu Gly Asp Met Leu Arg Ala Ala Gln Thr Trp Thr Pro Lys Asp Lys
 450 455 460

Thr Lys Val Leu Leu Glu His His His His His His
 465 470 475

<210> 11
 <211> 469
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión

10 <400> 11

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

ES 2 662 611 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

ES 2 662 611 T3

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 Ala Lys Asp Pro Ser Trp Ala Ser Ile
 370 375 380

Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro Tyr His Ala Phe Val Glu Arg Leu Asn
 385 390 395 400

Ile Ala Leu Asp Asn Gly Leu Pro Glu Gly Thr Pro Lys Asp Pro Ile
 405 410 415

Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser Asn Ala Asn Lys Glu Ala Gln Lys Leu
 420 425 430

Leu Gln Ala Arg Gly His Thr Asn Ser Pro Leu Gly Asp Met Leu Arg
 435 440 445

Ala Ala Gln Thr Trp Thr Pro Lys Asp Lys Thr Lys Val Leu Glu His
 450 455 460

His His His His His
 465

<210> 12
 <211> 363
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión

10

<400> 12

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

ES 2 662 611 T3

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Lys Asp
 260 265 270

Pro Ser Trp Ala Ser Ile Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro Tyr His Ala
 275 280 285

Phe Val Glu Arg Leu Asn Ile Ala Leu Asp Asn Gly Leu Pro Glu Gly
 290 295 300

ES 2 662 611 T3

Thr Pro Lys Asp Pro Ile Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser Asn Ala Asn
305 310 315 320

Lys Glu Ala Gln Lys Leu Leu Gln Ala Arg Gly His Thr Asn Ser Pro
325 330 335

Leu Gly Asp Met Leu Arg Ala Ala Gln Thr Trp Thr Pro Lys Asp Lys
340 345 350

Thr Lys Val Leu Glu His His His His His His
355 360

<210> 13
<211> 259
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Proteína de fusión

10

<400> 13

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

ES 2 662 611 T3

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 Ala Lys Asp Pro Ser Trp Ala Ser Ile Leu Gln
165 170 175

Gly Leu Glu Glu Pro Tyr His Ala Phe Val Glu Arg Leu Asn Ile Ala
180 185 190

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

Ser Leu Ala Tyr Ser Asn Ala Asn Lys Glu Ala Gln Lys Leu Leu Gln
210 215 220

Ala Arg Gly His Thr Asn Ser Pro Leu Gly Asp Met Leu Arg Ala Ala
225 230 235 240

Gln Thr Trp Thr Pro Lys Asp Lys Thr Lys Val Leu Glu His His His
245 250 255

His His His

<210> 14
<211> 498
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Proteína de fusión

<400> 14

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

ES 2 662 611 T3

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

ES 2 662 611 T3

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 Gln Met Lys Asp Leu Gln Ala Ile Lys
 370 375 380

Gln Glu Val Ser Gln Ala Ala Pro Gly Ser Pro Gln Phe Met Gln Thr
 385 390 395 400

Ile Arg Leu Ala Val Gln Gln Phe Asp Pro Thr Ala Lys Asp Leu Gln
 405 410 415

Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Val Ala Ser Leu His His
 420 425 430

Gln Gln Leu Asp Ser Leu Ile Ser Glu Ala Glu Thr Arg Gly Ile Thr
 435 440 445

Gly Tyr Asn Pro Leu Ala Gly Pro Leu Arg Val Gln Ala Asn Asn Pro
 450 455 460

Gln Gln Gln Gly Leu Arg Arg Glu Tyr Gln Gln Leu Trp Leu Ala Ala
 465 470 475 480

Phe Ala Ala Leu Pro Gly Ser Ala Lys Asp Leu Glu His His His His
 485 490 495

His His

<210> 15
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión

10

<400> 15

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

ES 2 662 611 T3

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Met Lys
 260 265 270

Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu Val Ser Gln Ala Ala Pro Gly Ser
 275 280 285

ES 2 662 611 T3

Pro Gln Phe Met Gln Thr Ile Arg Leu Ala Val Gln Gln Phe Asp Pro
 290 295 300

Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Ala Ser Ser Leu
 305 310 315 320

Val Ala Ser Leu His His Gln Gln Leu Asp Ser Leu Ile Ser Glu Ala
 325 330 335

Glu Thr Arg Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Pro Leu Ala Gly Pro Leu Arg
 340 345 350

Val Gln Ala Asn Asn Pro Gln Gln Gln Gly Leu Arg Arg Glu Tyr Gln
 355 360 365

Gln Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ala Ala Leu Pro Gly Ser Ala Lys Asp
 370 375 380

Leu Glu His His His His His His
 385 390

<210> 16
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión

10

<400> 16

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

ES 2 662 611 T3

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 Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Gly Ser Gly Gly Gly Gln Met Lys Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu
 165 170 175

Val Ser Gln Ala Ala Pro Gly Ser Pro Gln Phe Met Gln Thr Ile Arg
 180 185 190

Leu Ala Val Gln Gln Phe Asp Pro Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu
 195 200 205

Leu Gln Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Val Ala Ser Leu His His Gln Gln
 210 215 220

Leu Asp Ser Leu Ile Ser Glu Ala Glu Thr Arg Gly Ile Thr Gly Tyr
 225 230 235 240

Asn Pro Leu Ala Gly Pro Leu Arg Val Gln Ala Asn Asn Pro Gln Gln
 245 250 255

Gln Gly Leu Arg Arg Glu Tyr Gln Gln Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ala
 260 265 270

Ala Leu Pro Gly Ser Ala Lys Asp Leu Glu His His His His His His
 275 280 285

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

5

<220>
 <223> Conector

10

<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

15

20

<210> 18
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

ES 2 662 611 T3

<220>

<223> Proteína de fusión de EcSlyD-EcSlyD-p24(152-350)/HTLV-II

5 <400> 18

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

ES 2 662 611 T3

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 Gln Met Lys Asp Leu Gln Ala Ile Lys
 370 375 380

Gln Glu Val Ser Ser Ser Ala Leu Gly Ser Pro Gln Phe Met Gln Thr
 385 390 395 400

Leu Arg Leu Ala Val Gln Gln Phe Asp Pro Thr Ala Lys Asp Leu Gln
 405 410 415

Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Val Val Ser Leu His His
 420 425 430

Gln Gln Leu Asn Thr Leu Ile Thr Glu Ala Glu Thr Arg Gly Met Thr
 435 440 445

Gly Tyr Asn Pro Met Ala Gly Pro Leu Arg Met Gln Ala Asn Asn Pro

ES 2 662 611 T3

450

455

460

Ala Gln Gln Gly Leu Arg Arg Glu Tyr Gln Asn Leu Trp Leu Ala Ala
465 470 475 480

Phe Ser Thr Leu Pro Gly Asn Thr Arg Asp Pro Ser Trp Ala Ala Ile
485 490 495

Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro Tyr Ala Ala Phe Val Glu Arg Leu Asn
500 505 510

Val Ala Leu Asp Asn Gly Leu Pro Glu Gly Thr Pro Lys Glu Pro Ile
515 520 525

Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser Asn Ala Asn Lys Glu Ala Gln Lys Ile
530 535 540

Leu Gln Ala Arg Gly His Thr Asn Ser Pro Leu Gly Glu Met Leu Arg
545 550 555 560

Thr Ala Gln Ala Trp Thr Pro Lys Asp Lys Thr Lys Val Leu Leu Glu
565 570 575

His His His His His His
580

<210> 19
<211> 476
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Proteína de fusión de EcFkpA-p24(152-350)/HTLV-II

<400> 19

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

ES 2 662 611 T3

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
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Met Lys
 260 265 270
 Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu Val Ser Ser Ser Ala Leu Gly Ser
 275 280 285
 Pro Gln Phe Met Gln Thr Leu Arg Leu Ala Val Gln Gln Phe Asp Pro
 290 295 300
 Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Ala Ser Ser Leu
 305 310 315 320
 Val Val Ser Leu His His Gln Gln Leu Asn Thr Leu Ile Thr Glu Ala

ES 2 662 611 T3

325

330

335

Glu Thr Arg Gly Met Thr Gly Tyr Asn Pro Met Ala Gly Pro Leu Arg
340 345 350

Met Gln Ala Asn Asn Pro Ala Gln Gln Gly Leu Arg Arg Glu Tyr Gln
355 360 365

Asn Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ser Thr Leu Pro Gly Asn Thr Arg Asp
370 375 380

Pro Ser Trp Ala Ala Ile Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro Tyr Ala Ala
385 390 395 400

Phe Val Glu Arg Leu Asn Val Ala Leu Asp Asn Gly Leu Pro Glu Gly
405 410 415

Thr Pro Lys Glu Pro Ile Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser Asn Ala Asn
420 425 430

Lys Glu Ala Gln Lys Ile Leu Gln Ala Arg Gly His Thr Asn Ser Pro
435 440 445

Leu Gly Glu Met Leu Arg Thr Ala Gln Ala Trp Thr Pro Lys Asp Lys
450 455 460

Thr Lys Val Leu Leu Glu His His His His His His
465 470 475

<210> 20
<211> 372
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Proteína de fusión de EcSkp-p24(152-350)/HTLV-II

<400> 20

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

ES 2 662 611 T3

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 Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Gly Gly Gly Gln Met Lys Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu
 165 170 175
 Val Ser Ser Ser Ala Leu Gly Ser Pro Gln Phe Met Gln Thr Leu Arg
 180 185 190
 Leu Ala Val Gln Gln Phe Asp Pro Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu
 195 200 205
 Leu Gln Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Val Val Ser Leu His His Gln Gln
 210 215 220
 Leu Asn Thr Leu Ile Thr Glu Ala Glu Thr Arg Gly Met Thr Gly Tyr
 225 230 235 240
 Asn Pro Met Ala Gly Pro Leu Arg Met Gln Ala Asn Asn Pro Ala Gln
 245 250 255
 Gln Gly Leu Arg Arg Glu Tyr Gln Asn Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ser
 260 265 270
 Thr Leu Pro Gly Asn Thr Arg Asp Pro Ser Trp Ala Ala Ile Leu Gln
 275 280 285
 Gly Leu Glu Glu Pro Tyr Ala Ala Phe Val Glu Arg Leu Asn Val Ala
 290 295 300
 Leu Asp Asn Gly Leu Pro Glu Gly Thr Pro Lys Glu Pro Ile Leu Arg

ES 2 662 611 T3

305	310	315	320
Ser Leu Ala Tyr	Ser Asn Ala Asn Lys Glu Ala Gln Lys Ile Leu Gln		
	325	330	335
Ala Arg Gly His Thr Asn Ser Pro Leu Gly Glu Met Leu Arg Thr Ala			
	340	345	350
Gln Ala Trp Thr Pro Lys Asp Lys Thr Lys Val Leu Leu Glu His His			
	355	360	365
His His His His			
	370		
<210> 21			
<211> 361			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Proteína de fusión de EcFkpA-p24/CTD(267-350)/HTLV-II			
<400> 21			
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

5

10

ES 2 662 611 T3

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro Ser Trp
260 265 270

Ala Ala Ile Leu Gln Gly Leu Glu Glu Pro Tyr Ala Ala Phe Val Glu
275 280 285

Arg Leu Asn Val Ala Leu Asp Asn Gly Leu Pro Glu Gly Thr Pro Lys
290 295 300

Glu Pro Ile Leu Arg Ser Leu Ala Tyr Ser Asn Ala Asn Lys Glu Ala
305 310 315 320

Gln Lys Ile Leu Gln Ala Arg Gly His Thr Asn Ser Pro Leu Gly Glu
325 330 335

Met Leu Arg Thr Ala Gln Ala Trp Thr Pro Lys Asp Lys Thr Lys Val
340 345 350

Leu Leu Glu His His His His His His
355 360

<210> 22
<211> 257
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Proteína de fusión de EcSklp-p24/CTD(267-350)/HTLV-II

<400> 22

ES 2 662 611 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 Pro Ser Trp Ala Ala Ile Leu Gln Gly Leu Glu
165 170 175

Glu Pro Tyr Ala Ala Phe Val Glu Arg Leu Asn Val Ala Leu Asp Asn
180 185 190

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

Tyr Ser Asn Ala Asn Lys Glu Ala Gln Lys Ile Leu Gln Ala Arg Gly
210 215 220

His Thr Asn Ser Pro Leu Gly Glu Met Leu Arg Thr Ala Gln Ala Trp
225 230 235 240

Thr Pro Lys Asp Lys Thr Lys Val Leu Leu Glu His His His His His
245 250 255

His

- 5 <210> 23
- <211> 392
- <212> PRT
- <213> Artificial

10 <220>

ES 2 662 611 T3

<223> Proteína de fusión de EcFkpA-p24/NTD(152-266)/HTLV-II

<400> 23

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

5

ES 2 662 611 T3

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Met Lys
 260 265 270

Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu Val Ser Ser Ser Ala Leu Gly Ser
 275 280 285

Pro Gln Phe Met Gln Thr Leu Arg Leu Ala Val Gln Gln Phe Asp Pro
 290 295 300

Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu Leu Gln Tyr Leu Ala Ser Ser Leu
 305 310 315 320

Val Val Ser Leu His His Gln Gln Leu Asn Thr Leu Ile Thr Glu Ala
 325 330 335

Glu Thr Arg Gly Met Thr Gly Tyr Asn Pro Met Ala Gly Pro Leu Arg
 340 345 350

Met Gln Ala Asn Asn Pro Ala Gln Gln Gly Leu Arg Arg Glu Tyr Gln
 355 360 365

Asn Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ser Thr Leu Pro Gly Asn Thr Arg Asp
 370 375 380

Leu Glu His His His His His His
 385 390

<210> 24
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión de EcSklp-p24/NTD(152-266)/HTLV-II

10

<400> 24

ES 2 662 611 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 Gln Met Lys Asp Leu Gln Ala Ile Lys Gln Glu
 165 170 175

Val Ser Ser Ser Ala Leu Gly Ser Pro Gln Phe Met Gln Thr Leu Arg
 180 185 190

Leu Ala Val Gln Gln Phe Asp Pro Thr Ala Lys Asp Leu Gln Asp Leu
 195 200 205

Leu Gln Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Val Val Ser Leu His His Gln Gln
 210 215 220

Leu Asn Thr Leu Ile Thr Glu Ala Glu Thr Arg Gly Met Thr Gly Tyr
 225 230 235 240

Asn Pro Met Ala Gly Pro Leu Arg Met Gln Ala Asn Asn Pro Ala Gln
 245 250 255

Gln Gly Leu Arg Arg Glu Tyr Gln Asn Leu Trp Leu Ala Ala Phe Ser
 260 265 270

Thr Leu Pro Gly Asn Thr Arg Asp Leu Glu His His His His His His
 275 280 285

5 <210> 25
 <211> 108

ES 2 662 611 T3

<212> PRT
<213> Virus linfótrofo de linfocitos T humanos de tipo 1

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Xaa = Cys o Ala o Ser

<400> 25

Ser Leu Ala Ser Gly Lys Ser Leu Leu His Glu Val Asp Lys Asp Ile
1 5 10 15

Ser Gln Leu Thr Gln Ala Ile Val Lys Asn His Lys Asn Leu Leu Lys
20 25 30

Ile Ala Gln Tyr Ala Ala Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe
35 40 45

Trp Glu Gln Gly Gly Leu Xaa Lys Ala Leu Gln Glu Gln Xaa Xaa Phe
50 55 60

Leu Asn Ile Thr Asn Ser His Val Ser Ile Leu Gln Glu Arg Pro Pro
65 70 75 80

Leu Glu Asn Arg Val Leu Thr Gly Trp Gly Leu Asn Trp Asp Leu Gly
85 90 95

10 Leu Ser Gln Trp Ala Arg Glu Ala Leu Gln Thr Gly
100 105

<210> 26
<211> 304
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<223> Proteína de fusión de EcSlyD-gp21(339-446)/HTLV-1

20 <400> 26

ES 2 662 611 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
 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 Ser Leu Ala Ser
 180 185 190

Gly Lys Ser Leu Leu His Glu Val Asp Lys Asp Ile Ser Gln Leu Thr
 195 200 205

Gln Ala Ile Val Lys Asn His Lys Asn Leu Leu Lys Ile Ala Gln Tyr
 210 215 220

Ala Ala Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Trp Glu Gln Gly
 225 230 235 240

Gly Leu Ala Lys Ala Leu Gln Glu Gln Ala Ala Phe Leu Asn Ile Thr

ES 2 662 611 T3

245 250 255

Asn Ser His Val Ser Ile Leu Gln Glu Arg Pro Pro Leu Glu Asn Arg
260 265 270

Val Leu Thr Gly Trp Gly Leu Asn Trp Asp Leu Gly Leu Ser Gln Trp
275 280 285

Ala Arg Glu Ala Leu Gln Thr Gly Leu Glu His His His His His His
290 295 300

<210> 27
 5 <211> 286
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Proteína de fusión de EcSlpA-gp21(339-446)/HTLV-1

<400> 27

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

ES 2 662 611 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Lys
 165 170 175
 Ser Leu Leu His Glu Val Asp Lys Asp Ile Ser Gln Leu Thr Gln Ala
 180 185 190
 Ile Val Lys Asn His Lys Asn Leu Leu Lys Ile Ala Gln Tyr Ala Ala
 195 200 205
 Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Trp Glu Gln Gly Gly Leu
 210 215 220
 Ala Lys Ala Leu Gln Glu Gln Ala Ala Phe Leu Asn Ile Thr Asn Ser
 225 230 235 240
 His Val Ser Ile Leu Gln Glu Arg Pro Pro Leu Glu Asn Arg Val Leu
 245 250 255
 Thr Gly Trp Gly Leu Asn Trp Asp Leu Gly Leu Ser Gln Trp Ala Arg
 260 265 270
 Glu Ala Leu Gln Thr Gly Leu Glu His His His His His His
 275 280 285

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un antígeno p24 de HTLV soluble que consiste en el dominio C-terminal de p24 de HTLV que tiene SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 7, en el que dicho antígeno p24 de HTLV carece del dominio N-terminal como se especifica en SEQ ID NO. 2 y en SEQ ID NO. 6 y en el que dicho antígeno p24 de HTLV soluble se fusiona a una chaperona oligomérica.
2. Un antígeno p24 de HTLV soluble de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha chaperona oligomérica es una chaperona seleccionada del grupo que consiste en Skp y FkpA.
- 10 3. Una proteína de fusión de p24 de HTLV soluble que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12, 13, 21 o 22.
- 15 4. Un procedimiento de producción de un antígeno p24 de HTLV soluble e inmunorreactivo, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de
- cultivo de células huésped transformadas con un vector de expresión que comprende una molécula de ADN recombinante unida de forma funcional que codifica un antígeno p24 de HTLV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3
 - 20 - expresión de dicho antígeno p24 de HTLV y
 - purificación de dicho antígeno p24 de HTLV.
- 25 5. Una composición de antígenos de HTLV que comprende un antígeno p24 de HTLV de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 y un antígeno gp21 de HTLV que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 25, en la que dichos antígenos p24 y gp21 se expresan como polipéptidos separados.
- 30 6. Un procedimiento para detectar anticuerpos específicos para HTLV en una muestra aislada, en el que un antígeno p24 de HTLV de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 o una composición de antígenos de HTLV de acuerdo con la reivindicación 5 se usa como un reactivo de captura y/o como una pareja de unión para dichos anticuerpos contra HTLV.
- 35 7. Un procedimiento para detectar anticuerpos específicos para HTLV en una muestra aislada, comprendiendo dicho procedimiento
- a) formar una mezcla de inmunorreacción mezclando una muestra de líquido corporal con antígeno p24 de HTLV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o con una composición de antígenos de HTLV de acuerdo con la reivindicación 5
 - 40 b) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un período de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos contra dicho antígeno de HTLV o composición de antígenos de HTLV presentes en la muestra de líquido corporal inmunorreacten con dicho antígeno de HTLV o composición de antígenos de HTLV para formar un producto de inmunorreacción; y
 - 45 c) detectar la presencia y/o la concentración de cualquiera de dicho producto de inmunorreacción.
- 50 8. Un procedimiento para detectar anticuerpos específicos para HTLV en una muestra aislada de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha inmunorreacción se lleva a cabo en un formato de sándwich de doble antígeno asimétrico que comprende
- a) añadir a dicha muestra un primer antígeno p24 de HTLV que se puede unir directa o indirectamente a una fase sólida y transporta un grupo efector que es parte de un par de unión bioafín, y un segundo antígeno p24 de HTLV que transporta un marcador detectable, en el que dicho primer y segundo antígenos p24 de HTLV se unen específicamente a dichos anticuerpos anti-HTLV,
 - 55 b) formar una mezcla de inmunorreacción que comprende el primer antígeno, el anticuerpo de muestra y el segundo antígeno, en el que se añade una fase sólida que transporta el grupo efector correspondiente de dicho par de unión bioafín antes, durante o después de formar la mezcla de inmunorreacción,
 - 60 c) mantener dicha mezcla de inmunorreacción durante un período de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos anti-HTLV contra dichos antígenos p24 de HTLV en la muestra de líquido corporal inmunorreacten con dichos antígenos p24 de HTLV para formar un producto de inmunorreacción,
 - 65 d) separar la fase líquida de la fase sólida
 - e) detectar la presencia de cualquiera de dicho producto de inmunorreacción en la fase sólida o líquida o ambas.

- 5 9. Un procedimiento para detectar anticuerpos específicos para HTLV de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho primer antígeno es un antígeno p24 de HTLV fusionado a FkpA y transporta un resto de biotina, dicho segundo antígeno es un antígeno p24 de HTLV fusionado a Skp y está marcado con un complejo de rutenio electroquimioluminiscente, o
- 10 en el que dicho primer antígeno es un antígeno p24 de HTLV fusionado a Skp y transporta un resto de biotina, dicho segundo antígeno es un antígeno p24 de HTLV fusionado a FkpA y está marcado con un complejo de rutenio electroquimioluminiscente.
- 15 10. Uso de un antígeno p24 de HTLV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de una composición de antígenos de HTLV de acuerdo con la reivindicación 5 en una prueba de diagnóstico *in vitro* para la detección de anticuerpos anti-HTLV.
- 20 11. Un kit de reactivos para la detección de anticuerpos anti-HTLV, que comprende al menos un antígeno p24 de HTLV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición de antígenos de HTLV de acuerdo con la reivindicación 5.

