



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 294 196**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02798355 .0**

86 Fecha de presentación : **20.12.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1578793**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2005**

54 Título: **Métodos para elaborar y utilizar complejos solubles de proteínas diana y chaperonas peptil prolil isomerasas.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Faatz, Elke;**
Scholz, Christian y
Schaarschmidt, Peter

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para elaborar y utilizar complejos solubles de proteínas diana y chaperonas peptil prolil isomerasas.

- 5 La actual invención está relacionada con el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA). Enseña especialmente la producción de un complejo chaperona- $A\beta$ soluble y el uso ventajoso de tal complejo chaperona- $A\beta$, especialmente en la detección del $A\beta$ en un inmunoanálisis, así como su uso como inmunógeno.

Antecedentes

- 10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno degenerativo del cerebro que se caracteriza clínicamente por la pérdida progresiva de memoria, conocimiento, razonamiento, juicio y estabilidad emocional que conduce gradualmente a un deterioro mental profundo y en última instancia a la muerte. La EA es una causa muy común de deterioro mental progresivo (demencia) en seres humanos de edad avanzada y se cree que representa la cuarta causa médica más
15 común de muerte en los Estados Unidos. La EA se ha observado en todas las razas y grupos étnicos en todo el mundo y representa un problema de salud pública importante en el presente y en el futuro.

- En Alemania se diagnostican 65.000 nuevos casos aproximadamente cada año. Actualmente se estima que la enfermedad afecta a entre dos y tres millones de individuos aproximadamente en los Estados Unidos solamente. La
20 EA es actualmente incurable. No se conoce actualmente ningún tratamiento para su prevención eficaz o que revierta sus síntomas o el curso de la enfermedad.

- El cerebro de individuos que presentan EA muestra lesiones características denominadas placas seniles y ovillos neurofibrilares. Generalmente estas lesiones se encuentran en abundancia en varias áreas del cerebro humano importantes para la memoria y la función cognitiva en pacientes con EA. Se hallan a veces en menor cantidad y con una
25 distribución anatómica más restringida en los cerebros de seres humanos de edad avanzada que no padecen manifestaciones clínicas de la EA. Las placas seniles y la angiopatía amiloide son características también de los cerebros de individuos a partir de una cierta edad que presentan trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down) y de la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandesa (HCHWA-D).

- 30 Actualmente, un diagnóstico definitivo de la EA requiere generalmente la observación de las lesiones ya mencionadas en el tejido cerebral de los pacientes que han muerto con la enfermedad o, raramente, en las pequeñas muestras de tejido cerebral extraídas mediante una biopsia durante un procedimiento neuroquirúrgico agresivo. El constituyente químico principal de las placas seniles y de los depósitos amiloides vasculares (angiopatía amiloide) característicos de
35 la EA y de otros trastornos mencionados anteriormente es una proteína de aproximadamente 4,2 kilodaltons (kD) de alrededor de 39-43 aminoácidos originalmente designada como el péptido β -amiloide ($A\beta$) o algunas veces $AP\beta$, $A\beta P$ o $\beta/A4$. La nomenclatura $A\beta$ se acepta hoy en día generalmente para describir este polipéptido.

- El $A\beta$ se purificó por primera vez y se divulgó una secuencia parcial del aminoácido en Glenner, G.G., y Wong, C.W., Biochem. Biophys. Res. Commun. 120 (1984) 885-890. El procedimiento de aislamiento y los datos de secuencia para los primeros 28 aminoácidos se describen en la patente estadounidense Núm. 4 666 829. Las formas de $A\beta$
40 de más de 40 aminoácidos fueron divulgadas por primera vez por Kang, J., *et al.*, Nature 325 (1987) 733-736.

- Roher, A.E., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 10836-10840 demostraron que $A\beta$ (1-42) es el componente principal en las placas neuríticas (el 90%) con cantidades significativas de residuos aspartato isómeros y racémicos. Los autores también demostraron que el $A\beta$ (17-42) predomina también en las placas difusas (el 70%), mientras que
45 $A\beta$ (1-40) es el constituyente principal de las placas meningovasculares, que comprende el 60% del $A\beta$ total y el $A\beta$ (1-42) representa el 75% del $A\beta$ total en los depósitos parenquimales de los vasos.

- Iwatsubo, T., *et al.*, Neuron 13 (1994) 45-53 demostraron que las placas seniles $A\beta$ 42(43) positivas son los principales tipos de $A\beta$ en cerebros con EA esporádica.
50

- Los análisis de biología molecular y los análisis químicos de proteínas realizados desde hace varios años han demostrado que el $A\beta$ es un fragmento pequeño de una proteína precursora mucho mayor, a la que se hace referencia
55 como la proteína precursora amiloide (PPA) producida por las células en varios tejidos de distintos animales, incluyendo a los humanos. Los conocimientos sobre la estructura del gen que codifica la PPA han demostrado que el $A\beta$ aparece en forma de fragmento peptídico que se ha originado por escisión a partir del extremo carboxílico de la PPA mediante una serie de enzimas denominadas α , β y γ -secretasas. Actualmente se desconoce el mecanismo bioquímico exacto mediante el cual se escinde el fragmento $A\beta$ a partir de la PPA y se deposita posteriormente en forma de placas
60 amiloides en el tejido cerebral y en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales y meníngeos.

- Varios indicios indican que la deposición de $A\beta$ de forma progresiva en el cerebro desempeña un papel seminal en la patogenia de la EA y puede preceder a los síntomas cognitivos durante años o décadas (para revisión, véase Selkoe, D.J., J. Neuropath. and Exp. Neurol. 53 (1994) 438-447; y Selkoe, D.J., Neuron 6 (1991) 487).
65

A pesar del progreso, que se ha hecho en entender los mecanismos subyacentes de la EA, existe la necesidad de desarrollar métodos para su uso en el diagnóstico de la enfermedad.

Numerosos estudios bioquímicos con microscopía electrónica y estudios immunoquímicos han divulgado el hecho de que el A β es muy insoluble en soluciones fisiológicas a pH normal. Véase, por ejemplo, Glenner, G.G., and Wong, C.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122 (1984) 1131-1135; Masters, C.L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 4245-4249; Selkoe, D.J., *et al.*, *J. Neurochem.* 46 (1986) 1820-1834.

Además, la insolubilidad se predijo gracias a la secuencia de aminoácidos de el A β , con la que es consecuente y que incluye una porción de aminoácidos hidrófobos que constituye parte de la región en la que se ancla la proteína precursora (PPA) en la membrana lipídica de las células. Se predice que las proteínas hidrófobas que se anclan a lípidos, tales como la parte A β de la PPA, permanecen asociadas con las membranas o los fragmentos celulares de la membrana, para de éste modo no estar presentes en fluidos fisiológicos extracelulares. Los estudios ya mencionados y muchos otros han divulgado la insolubilidad en soluciones fisiológicas de el A β purificada nativa a partir de depósitos amiloides de cerebros con EA o de péptidos sintéticos que contienen la secuencia A β . La extracción de A β de depósitos amiloides cerebrales y su solubilidad subsiguiente ha requerido el uso de solventes y de desnaturalizantes no fisiológicos potentes.

Las soluciones salinas fisiológicas y tamponadas que mimetizan los fluidos extracelulares de los tejidos humanos no han podido solubilizar el A β .

En general, los inmunoanálisis se realizan a pH fisiológico. Los polipéptidos solubles en condiciones fisiológicas de pH, por lo tanto, se utilizan extensivamente en varios métodos de inmunoanálisis, como por ejemplo, en el ELISA, (ensayo de inmunoabsorción enzimática), por ejemplo para el diagnóstico y cribado de ciertas enfermedades.

Debido a su insolubilidad en condiciones fisiológicas de pH, y debido a su naturaleza adhesiva, el péptido A β es difícil de utilizar en un inmunoanálisis, p. ej. A β es difícil de manipular en un ensayo tipo sándwich, porque tiende a agregarse o incluso a precipitar. Debido a su naturaleza adhesiva, A β puede originar resultados falsos causados por la unión inespecífica.

Aunque es posible solubilizar A β mediante reactivos caotrópicos potentes o detergentes apropiados, el material solubilizado de tal manera tiene una utilidad limitada como herramienta de diagnóstico.

La insolubilidad de A β en condiciones tamponadas fisiológicas atribuye además a esta proteína el hecho de ser un blanco muy difícil en los procedimientos (bio-)químicos rutinarios. La gran mayoría de "la química utilizada en el marcado", es decir, los procedimientos químicos usados para unir un marcador, p. ej., un grupo marcador a un polipéptido, se basa en la química de los nucleófilos y de este modo se restringe bastante a un intervalo de pH que oscila entre pH 6 aproximadamente hasta un pH 8 aproximadamente y de este modo sólo funciona en condiciones tamponadas más o menos fisiológicas. Estos procedimientos rutinarios, p. ej., según lo descrito en Aslam, M. and Dent, A., *The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation"*, eds. M. Aslam and A. Dent, McMillan Reference, London (1998), pp. 216-363, no funcionan correctamente o son difíciles de realizar con el péptido A β .

Por lo tanto existe una enorme necesidad de proporcionar A β en una forma fácilmente soluble, una forma en la cual A β sea, p. ej., soluble a pH fisiológico, estable en solución y/o fácil de producir y/o manipular.

Era el objetivo de la actual invención investigar si A β se puede proporcionar en una forma, que sea fácilmente soluble en condiciones fisiológicas de pH.

Se observó que las enzimas que participan en el plegamiento, p. ej., varios miembros pertenecientes a la clase peptidil-prolil isomerasa (PPI), especialmente de la familia FKBP, no sólo poseen actividad catalítica, sino que aportan también una mejora drástica en la solubilidad de las proteínas amiloidogénicas, o hablando en términos más generales, en las proteínas que tienden a agregarse, como el péptido A β . Esto se realiza mediante la formación de complejos solubles con tales proteínas que de otro modo serían propensas a la agregación (es decir, sin formar chaperonas y en forma aislada). El A β que es poco soluble o insoluble en condiciones fisiológicas resultó ser soluble en condiciones fisiológicas suaves (es decir, sin la necesidad de añadir solubilizantes tales como detergentes o agentes caotrópicos) cuando está presente formando un complejo con una chaperona PPI. Así, pudimos producir, por ejemplo, los complejos solubles A β -chaperona, que están formados p. ej., por una proteína del péptido A β (1-42) (de otro modo propensa a la agregación) y SlyD, FkpA u otras FKBP como chaperonas que confieren solubilidad.

Un complejo soluble formado por un péptido A β y una chaperona de la clase PPI se puede obtener, por ejemplo, de una sola proteína recombinante que comprende un péptido A β y una chaperona de la clase PPI. Se describe una proteína recombinante que consta de A β y una chaperona seleccionada de la clase de chaperonas peptidil-prolil isomerasas.

Lo más sorprendente, una proteína de fusión que comprende un péptido A β y una chaperona PPI puede solubilizarse y renaturalizarse fácilmente y se ha descubierto que forma un complejo intramolecular A β -chaperona soluble que permite p. ej., el marcado conveniente de dicho complejo.

Es posible ahora proporcionar un A β en una forma fácilmente soluble para el uso como material estándar en los inmunoanálisis. Es también posible producir un complejo chaperona-A β marcado, en el que solo se marca la

chaperona, cerciorándose de que el antígeno A β no se modifica o se influencia negativamente (p. ej. en lo que a la conformación se refiere) por este marcado.

Los complejos de A β -chaperona que describimos aquí proporcionan medios convenientes de producir un péptido A β soluble marcado para su uso en inmunoanálisis independientemente del formato del método de detección que se utilice.

Los nuevos complejos formados por A β y SlyD, por ejemplo, son fácilmente solubles, p. ej., en condiciones fisiológicas pueden marcarse fácilmente en intervalos de pH convenientes y pueden utilizarse con muchas ventajas en la detección de A β mediante técnicas inmunológicas o para la inmunización.

Descripción breve de las figuras

Figura 1: Espectro UV del SS-A β (1-42) tras el plegamiento asistido por la matriz y la elución en gradiente.

El complejo A β -chaperona que se eluye a partir de una columna de Ni-NTA (níquel-nitrilo-triacetato) con una concentración de imidazol de 150 mM aproximadamente en un tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 7,8 y cloruro sódico 100 mM. El espectro UV se estudió a una concentración de proteína de 36 μ M. La forma del espectro (especialmente en la región de longitud de onda >300 nm) destaca la solubilidad notable del péptido A β “en forma de chaperona” presente en el Alzheimer.

No se observan efectos de la luz externa que indicarían fenómenos de agregación o de asociación. Obviamente, el portador de la chaperona SlyD-SlyD (=SS) confiere una solubilidad excepcional al péptido A β (1-42), que de otro modo presenta una predisposición hacia la agregación.

Figura 2: La purificación de SS-A β (1-42) según lo documentado mediante SDS-PAGE.

Se analizó el SS-A β (1-42) mediante SDS-PAGE como se obtiene por plegamiento asistido por matriz. Las muestras que aparecen son: proteína estándar M12 de Novagen (carril 1), fracción insoluble tras la lisis caotrópica (carril 2), fracción soluble tras la lisis caotrópica (carril 3), flujo a través de Ni-NTA (carril 5), mezcla de elución que consta de SS-A β (1-42) tras el plegamiento asistido por matriz (carril 7). En los carriles 4 y 6 no se aplicaron muestras. El gel indica que el SS-A β (1-42) soluble producido mediante recombinación está disponible (con una pureza asombrosamente elevada de > 90%) gracias a un protocolo de renaturalización/purificación en un solo paso.

Descripción detallada

La presente invención está relacionada con un método de producción de un polipéptido de fusión recombinante soluble formado por A β y una chaperona PPI en el que la chaperona PPI es una FKBP que posee actividad chaperona, que incluye: la solubilización de dicho polipéptido y el ajuste del tampón hasta condiciones fisiológicas, en las que el complejo A β -chaperona que se forma es soluble como mínimo en 100 nM medidos en una solución que tiene un pH de 7,4 y consiste en fosfato sódico 20 mM y cloruro sódico 150 mM.

Un péptido A β o “AB” de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier fragmento del PPA de al menos 20 aminoácidos contiguos de longitud que comprende el extremo C-terminal de la molécula A β que termina en la posición del aminoácido 38, 39, 40, 41, 42, o 43 de A β . Más preferido el péptido A β tiene una longitud de al menos 30 aminoácidos. Preferiblemente el A β es un A β completo que comienza en el aminoácido uno y termina en el C-terminal del A β . Los péptidos que terminan con los residuos de A β 40, 42 o 43, respectivamente son los extremos C-terminal preferidos. Especialmente preferidas son las formas A β formadas por los aminoácidos 1 hasta el aminoácido 42 del A β (=A β (1-42)) y el A β del aminoácido 1 hasta el aminoácido 43 del A β (=A β (1-43)). En el siguiente A β se le hace referencia también como la “proteína diana”.

Es obvio para los expertos en la materia que pueden utilizarse de manera ventajosa A β procedentes de otras especies de mamíferos diferentes a los humanos, así como variantes naturales o producidas sintéticamente y serán tratadas en la presente invención. El uso de A β procedentes del hombre y las variantes naturales de éstas son las formas de elección.

Una proteína se considera “básicamente insoluble” si en un tampón que consiste en fosfato sódico 20 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM es soluble a una concentración de 50 nM o inferior. A β es básicamente insoluble en dicho tampón y forma agregados y/o precipitados.

El complejo A β -chaperona de acuerdo con la presente invención, sin embargo, es “soluble” en un tampón compuesto de fosfato sódico 20 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM. En este tampón la proteína diana A β , que forma el complejo A β -PPI-chaperona, es soluble en una concentración de 100 nM o superior.

El término “complejo” se utiliza para indicar que el dominio del péptido que corresponde a A β y el dominio del péptido que corresponde a la chaperona interaccionan entre ellos, por lo que la chaperona confiere un efecto solubilizante al A β .

La producción del complejo chaperona-proteína diana soluble empieza con unas condiciones tampón que dan lugar a la solubilización, es decir con un tampón en el que ambos, la proteína diana y la chaperona son solubles. Un tampón adecuado, que puede denominarse “no fisiológico” o tampón “solubilizante”, debe cumplir el requisito de que la proteína diana y la chaperona PPI no se desnaturalicen o al menos no se desnaturalicen de modo irreversible.

5 Empezando con estas condiciones tampón, la chaperona se une a la proteína diana y se permite un cambio en las condiciones del tampón de condiciones no fisiológicas a fisiológicas sin que la proteína diana precipite.

Un tampón apropiado (no fisiológico), es decir, un tampón en el que la proteína diana y la chaperona PPI son solubles puede requerir el uso de un pH bajo o elevado o de una concentración de sal caotrópica o de la combinación

10 de éstos.

Aunque una chaperona y un péptido A β pueden utilizarse como polipéptidos separados, se ha observado que es ventajoso unir ambas proteínas mediante enlace covalente. Tal enlace covalente es posible mediante procedimientos químicos que permiten obtener enlaces cruzados convencionales; preferiblemente, sin embargo, el enlace covalente se

15 consigue mediante la producción de un polipéptido recombinante que comprende un péptido A β y una chaperona.

En otro modo de realización preferido, la presente invención presenta un proceso para la producción de un complejo A β -chaperona soluble que comprende los pasos de solubilización, en condiciones tampón apropiadas, una proteína compuesta por un A β unido mediante recombinación y una proteína chaperona seleccionada de la clase de las peptidil-prolil isomerasas y posteriormente el ajuste del tampón hasta condiciones fisiológicas. De este modo se obtiene un

20 complejo intramolecular que es soluble en una concentración de 100 nM como mínimo en un tampón que tiene un pH de 7,4 y consiste en fosfato sódico 20 mM y cloruro sódico 150 mM. Más preferido es este proceso si se realiza partiendo de los llamados cuerpos de inclusión.

En el caso de la producción de un complejo intramolecular que consiste en una chaperona PPI y A β el tampón solubilizante es preferiblemente un tampón con una concentración de sal caotrópica bastante elevada, p. ej., 6,0 M de cloruro de guanidina con un pH de 7,8 aproximadamente. Tras la renaturalización la proteína diana adquiere su

25 estructura nativa y se forma el complejo intramolecular soluble.

La presente invención presenta el uso de chaperonas derivadas de sustancias que ayudan al plegamiento denominadas peptidil-prolil isomerasas cis/trans (PPIs o PPIasas) (cf. Dartigalongue, C., and Raina, S., *Embo J.* 17 (1998) 3968-3980). Ejemplos bien conocidos de esta familia son los denominados CypA, PpiD (Dartigalongue, C. y Raina, S., *supra*; Schmid, F. X., *Molecular chaperones in the life cycle of proteins*, eds. A.L. Fink and Y. Goto, Marcel Dekker Inc., New York (1998), pp. 361-389), FkpA (Danese, P.N., *et al.*, *Genes Dev.* 9 (1995) 387-398) y el factor desencadenante (Crooke, E., y Wickner, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 5216-5220; Stoller, G., *et al.*, *Embo J.* 14 (1995) 4939-4948).

35 Las peptidil-prolil isomerasas se subdividen en tres familias, las parvulinas (Schmid, F.X., *supra*; Rahfeld, J.U., *et al.*, *FEBS Lett.* 352 (1994) 180-184), las ciclofilinas (Fischer, G., *et al.*, *Nature* 337 (1989) 476-478), y la familia FKBP (Carril, W.S., *et al.*, *J. Protein Chem.* 10 (1991) 151-160). La familia FKBP posee una característica bioquímica interesante: sus miembros se han identificado originariamente gracias a su capacidad de unión a los macrolidos, p. ej., FK 506 y rapamicina (Kay, J. E., *Biochem J.* 314 (1996) 361-385).

Algunas prolil isomerasas comprenden diferentes subunidades o módulos con diferente función, p. ej., un módulo que posee actividad catalítica y un módulo que contiene la chaperona o la capacidad de unión. Tales miembros

45 modulares de la familia FKBP son FkpA (Ramm, K., and Pluckthun, A., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17106-17113), SlyD (Hottenrott, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15697-15701) y el factor desencadenante (Scholz, C., *et al.*, *Embo J.* 16 (1997) 54-58). Se utilizan preferiblemente los miembros de la familia FKBP de la clase PPI de chaperonas.

En otro modo de realización, se prefiere utilizar homólogos derivados de organismos eucariotas y se prefiere utilizar PPIasas de origen humano, porque estas PPIasas no deberían ser reconocidas por los anticuerpos del suero en el ser humano y así no deberían interferir en los análisis serológicos (es decir análisis basados en la detección de anticuerpos humanos).

Es también bien sabido y se valora que no es necesario utilizar siempre la secuencia completa de una chaperona molecular. Pueden también ser utilizados los fragmentos funcionales de las chaperonas (denominados módulos) que todavía poseen las capacidades y las funciones necesarias (cf. WO 98/13496).

Por ejemplo, FkpA es una PPI periplásmica que se sintetiza como una molécula precursora inactiva en el citosol bacteriano y se desplaza a través de la membrana citoplásmica. La forma activa de FkpA (FkpA madura o FkpA periplásmica) carece de la secuencia señal (aminoácidos 1 a 25) y consta así de los aminoácidos 26 a 270 de la molécula precursora. La información relevante de la secuencia en relación a FkpA se puede obtener fácilmente de las bases de datos públicas, e.g., de “SWISS-PROT” con el número de accesión P 45523.

Una molécula similar a FkpA, denominada SlyD, consiste en un dominio estructurado N-terminal responsable de las funciones catalíticas y de la chaperona y de un C-terminal sin estructurar en gran parte que es excepcionalmente rico en residuos de histidina y cisteína (Hottenrott, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15697-15701). Se observó que una variante truncada C-terminal de SlyD que comprende los aminoácidos 1-165 ejerce eficientemente sus funciones de

solubilización sobre el A β . Al contrario que en el tipo de SlyD silvestre, el peligro de que se produzcan transposiciones bisulfuro se evita con éxito en la variante de SlyD truncada (1-165) que se utiliza.

Las variantes de las chaperonas descritas anteriormente que presentan una o varias substituciones o deleciones de aminoácidos, pueden utilizarse también para realizar un proceso de acuerdo con la presente invención.

Por supuesto, la presente invención no está restringida al uso de los miembros de la clase de las peptidil-prolil isomerasas mencionados específicamente, sino que se puede también realizar usando las chaperonas que provienen de la misma clase de chaperonas, pero que derivan de una especie diferente de bacterias.

Las chaperonas apropiadas de fuentes alternativas y los fragmentos o los mutantes apropiados de las chaperonas PPI, pueden seleccionarse fácilmente usando los procedimientos según lo descrito en los ejemplos. Las fuentes alternativas preferidas de chaperonas PPI son *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella multocida* y *Treponema pallidum*.

En un modo de realización preferido de acuerdo con la presente invención, una chaperona PPIasa de unión se une mediante recombinación a un péptido A β de modo que produce una expresión elevada del producto del gen en el citosol bacteriano. Una PPIasa de unión, como se hace referencia en la presente invención, comprende por lo menos la unidad funcional que media la unión al sustrato péptido A β extendido (es decir, el sustrato de unión o el motivo chaperona), independientemente de su actividad PPIasa catalítica.

Se sabe (e.g., Scholz *et al.*, *supra*) que las PPI modulares se unen preferiblemente a las proteínas desnaturalizadas o parcialmente desnaturalizadas. Se ha descubierto que las PPIasas poseen la característica llamativa no sólo de catalizar el plegamiento de proteínas, sino también de formar los complejos estables con tales proteínas, de modo que les confieren solubilidad. Sorprendentemente, las PPIasas estudiadas (tales como TF, SlyD y FkpA) se unen y de este modo, p. ej., solubilizan péptidos A β con estructura nativa.

Existe abundancia de información sobre la formación de complejos entre las biomoléculas modelo, e.g., entre un anticuerpo y un antígeno (para revisión véase Braden, B.C., y Poljak, R.J., Faseb J. 9 (1995) 9-16). Generalmente, la formación y la disociación de complejos ocurren en paralelo; el complejo y las partes que se unen coexisten en equilibrio libre. Asimismo, lo mismo sucede para complejos entre las chaperonas PPI y las proteínas amiloidogénicas, como A β , según lo descrito en la presente invención.

La formación de un complejo, según lo descrito en la presente invención, es una característica especialmente importante, porque un complejo entre la chaperona y A β , una proteína que por si misma es básicamente insoluble, se ha observado que es fácilmente soluble, p. ej., en condiciones fisiológicas de pH. Los antígenos que son solubles en condiciones fisiológicas son muy útiles en aplicaciones para el diagnóstico. Pueden ser utilizados directamente, e.g., como material estándar. Además, pueden conjugarse con marcadores apropiados o grupos de unión apropiados.

Como ejemplo típico de un péptido amiloidogénico el péptido A β es extremadamente difícil de manipular y muestra características bastante inusuales. Según lo mencionado ya, una de las características más importantes de la molécula A β es su insolubilidad en condiciones fisiológicas de pH.

Se entiende por condiciones fisiológicas de pH aquellas que corresponden a las condiciones de concentración de sales y pH que existen en el plasma o el suero de animales y son definidas generalmente por un valor de pH 7,4 aproximadamente y una concentración de la sales de 150 mM aproximadamente. El complejo A β -chaperona de acuerdo con la presente invención es fácilmente soluble en estas condiciones tampón. El A β presente en estas condiciones es inmunológicamente activo, parecido así a una estructura similar a la nativa. Mientras que A β en ausencia o sin la aplicación de un tratamiento previo con un detergente apropiado es básicamente insoluble en condiciones fisiológicas de pH (p. ej., fosfato sódico 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM), el complejo descrito de acuerdo con esta invención es fácilmente soluble después del plegamiento según el protocolo apropiado. El A β , que contiene el complejo novedoso, es soluble por lo menos en una concentración de 100 nM, preferiblemente en una concentración de 1 μ M o superior, siendo la concentración de elección 10 μ M o superior. Así, la solubilidad aumenta substancialmente desde bajas concentraciones nanomolares a concentraciones micromolares aproximadamente.

Las condiciones de pH aplicadas para la solubilización y la renaturalización pueden modificarse según sea necesario y conveniente.

La concentración total de sales del tampón fisiológico no es crucial mientras se tomen precauciones para que el complejo chaperona-A β no se disocie y A β permanezca en solución. El tampón fisiológico consta preferiblemente de por lo menos de 10 mM del sistema tampón y como máximo 200 mM. El resto de los componentes del tampón, si los hay, pueden ser una sal sin una capacidad amortiguadora del pH significativa, e.g., cloruro sódico. El tampón fisiológico tiene preferiblemente una concentración de sal entre 20 mM y 500 mM, más preferida entre 50 mM y 300 mM y siendo la de elección entre 100 mM y 200 mM.

En un proceso de acuerdo con la presente invención, el tampón fisiológico puede modificarse para que tenga un valor de pH en el intervalo de 5,0 a 8,5; más preferido, el pH del tampón oscila entre 5,5 y pH 8,3. Aún más preferido,

las condiciones de pH fisiológico se definen mediante la concentración de sales, como se han descrito anteriormente y un valor de pH entre 6,0 y 8,0; el pH de elección de este tampón fisiológico está entre 6,5 y 7,8.

Un modo de realización preferido, de acuerdo con la presente invención, es un proceso de producción de un complejo soluble A β -chaperona, que consta de un péptido A β unido mediante recombinación a una peptidil-prolil isomerasa y que comprende: la solubilización de dicho polipéptido A β -chaperona recombinante y el ajuste del tampón a condiciones fisiológicas. Mientras que un péptido A β aislado se precipitaría espontáneamente al hacer esto, como parte de una proteína recombinante permanece en solución sorprendentemente en el proceso antedicho, según la presente invención. Este importante descubrimiento es muy probablemente debido a la formación de un complejo intramolecular entre el péptido A β y la chaperona.

En el caso de la producción de A β recombinante en *E. coli*, el A β recombinante producido se obtiene preferiblemente en forma de cuerpos de inclusión. Este material se solubiliza con un reactivo altamente caotrópico, p. ej., cloruro de guanidina 7,0 M. El polipéptido A β no está estructurado en gran parte en estas condiciones. Al modificar el tampón hasta condiciones fisiológicas de pH mediante pasos apropiados, el A β en solución adquiere lo que se percibe como su estructura similar a la nativa. La información sobre las partículas que desvían la luz (como los agregados) puede obtenerse fácilmente a partir de espectros UV estándares.

Lo que es importante acentuar aquí es el hecho de que el péptido A β dentro del complejo péptido A β -chaperona, según la presente invención, durante la transformación a condiciones fisiológicas de pH adopta lo que se considera un plegamiento similar a los de la estructura nativa. Por el contrario, el péptido A β , que se ha solubilizado mediante agentes caotrópicos a pH neutro, está en gran parte desestructurado, perdiendo así el orden de los epítomos conformacionales. Es posible solubilizar también un péptido A β de modo alternativo mediante el uso de detergentes. Por ejemplo, dodecil sulfato sódico (DSS) se ha utilizado con éxito para solubilizar A β . Sin embargo, dicho "material solubilizado mediante SDS" no es el material de elección, p. ej., para su uso en un inmunoanálisis. Además (como se ha descrito anteriormente) en dicho inmunoanálisis preferiblemente se utilizan anticuerpos que reaccionan con los epítomos conformacionales de A β y no puede descartarse que los detergentes eliminen parcialmente los epítomos conformacionales.

Preferiblemente, el complejo A β -chaperona de acuerdo con la presente invención se caracteriza por el plegamiento similar al de la forma nativa del A β que contienen. El A β plegado como en la forma nativa en este complejo, p. ej., posee las características inmunológicas o físicas necesarias.

La producción del complejo chaperona-AB soluble se inicia en condiciones de pH no fisiológicas. El tampón "no fisiológico" tiene que cumplir dos requisitos, que (a) el desplegamiento de A β es reversible a su estructura similar a la nativa, y (b) el desplegamiento de la chaperona PPI es reversible a su estructura similar a la nativa. Al empezar con estas condiciones de tampón, la chaperona se une a la proteína amiloidogénica diana y es posible un cambio de las condiciones de pH de no fisiológicas a más o menos fisiológicas, sin que el polipéptido que comprende el péptido amiloidogénico A β precipite.

Mientras las chaperonas se unen generalmente a proteínas desnaturalizadas y actúan sobre ellas, de este modo facilitando su plegamiento correcto, la situación en la que la presente invención se basa es muy diferente. Diferente desde el punto de vista de las funciones de la chaperona, en el método novedoso la chaperona parece unirse a la proteína plegada en la forma nativa y estabiliza esta proteína en unas condiciones tamponadas en las que A β es de otro modo insoluble y se agrega y/o precipita.

En un modo de realización preferido de acuerdo con la presente invención, la chaperona PPI se selecciona del grupo formado por FkpA, SlyD y el factor desencadenante.

Se ha observado que FkpA o SlyD mejoran especialmente la solubilidad de A β y forman complejos bastante estables con éstos. En consecuencia, otro modo de realización preferido se caracteriza porque la chaperona se selecciona del grupo que comprende FkpA y SlyD. Más preferiblemente, la chaperona SlyD se utiliza para conferir solubilidad al A β .

Según lo descrito anteriormente, los fragmentos de chaperonas se pueden utilizar también para proporcionar la función deseada. En caso de las chaperonas modulares, como los FKBP, que constan de un módulo catalítico y un módulo de unión, se prefiere que tal fragmento al menos comprenda el dominio de unión o que tal fragmento posea al menos una función comparable al dominio de unión. Un fragmento funcional preferido de la chaperona PPI es, por ejemplo, EcSly D (1-165) que deriva de *E. coli*. Los homólogos SlyD que corresponden a EcSlyD representan también modos preferidos de realización de acuerdo con la invención en trámite.

FKBP12 es un miembro de la familia FKBP presente en humanos y comprende básicamente el dominio catalítico isomerasa de una PPIasa. Ya que carece de un dominio de unión adicional al polipéptido, presenta una afinidad de unión reducida significativamente hacia sustratos de proteína desplegados o parcialmente desplegados en comparación con otros miembros de la familia FKBP. Se ha demostrado que el desplegamiento y el plegamiento de FKBP12 es un proceso reversible (Egan, D. A., *et al.*, Biochemistry 32 (1993) 1920-1927; Scholz, C., *et al.*, J. Biol. Chem. 271 (1996) 12703-12707). Se observa que el plegamiento y el desplegamiento de FkpA (25-270) y SlyD (1-165) no son tampoco reversibles, de modo que se satisface un requisito primordial del proceso descrito aquí.

Un complejo soluble de la chaperona A β puede prepararse también mezclando la chaperona PPI (p. ej., producido por técnicas de recombinación) y el A β obtenido mediante síntesis peptídica convencional o producido de mediante recombinación. Sin embargo, tal como se describe anteriormente, preferiblemente se obtiene A β fácilmente en una forma soluble mediante el tratamiento apropiado de un polipéptido recombinante que comprende una chaperona PPI y A β .

En un modo de realización preferido, la presente invención muestra un complejo que es soluble al menos en 100 nM en una solución que presenta un pH de 7,4 y está formada por fosfato sódico 20 mM y cloruro sódico 150 mM, que comprende un A β y una chaperona peptidil-prolil isomerasa, en el que el A β y la chaperona peptidil-prolil isomerasa están unidas mediante enlace covalente.

La formación de complejos es un proceso dinámico en el que la disociación y la reasociación sucede en paralelo. Esto se cumple para la asociación intermolecular e intramolecular (p. ej., en un constructo de fusión) entre, p. ej., SlyD y A β . Ya que A β precipita a partir de una solución tampón fisiológica, las concentraciones de ambos componentes deben ser elegidas para asegurar que esté presente sólo una concentración de A β en forma libre no crítica o en la que no se formen agregados y que la mayoría de A β esté unida y estabilizada en forma de un complejo A β -chaperona.

Se ha observado que una proporción de 1:1 (A β respecto a la chaperona PPI) es suficiente para formar el complejo soluble si ambos dominios se unen mediante enlaces covalentes. Proporciones molares más ventajosas entre A β y la chaperona son 1:1 y 1:2.

Un complejo soluble que comprende un péptido A β y una chaperona PPI unidos mediante recombinación representa un modo de realización muy preferido de acuerdo con la presente invención. El de elección es un péptido A β que se selecciona del grupo formado por A β (1-40), A β (1-42) y A β (1-43) y que compone dicho polipéptido recombinante.

El cambio de condiciones fisiológicas de pH a condiciones no fisiológicas se puede conseguir de diferentes maneras para una proteína recombinante que comprende al menos un dominio A β y al menos un dominio PPI-chaperona. Se obtienen fácilmente complejos intramoleculares soluble entre el dominio A β y, p. ej., el dominio SlyD mediante el ajuste de las condiciones de pH no fisiológicas a condiciones fisiológicas mediante la diálisis, dilución rápida o plegamiento asistido por matriz. El plegamiento asistido por matriz es un método preferido. La solución que se obtiene de este modo, que comprende el complejo A β -chaperona soluble puede utilizarse directamente para realizar más modificaciones.

Preferiblemente el péptido recombinante, de acuerdo con la presente invención, comprende un dominio A β y un dominio chaperona. En otro modo de realización preferido, la presente invención está relacionada con una proteína recombinante que comprende al menos un dominio A β y al menos dos dominios PPI-chaperona. Se prefieren también los polipéptidos recombinantes que comprenden un dominio A β y dos PPI-chaperona.

El polipéptido recombinante utilizado para obtener un complejo A β -chaperona soluble, de acuerdo con la presente invención, se expresa mediante técnicas de biología molecular estándares. Preferiblemente el gen correspondiente a la chaperona se localiza en el marco en dirección 5' del gen de la proteína diana, en un vector de expresión que comprende la información genética de A β y de la chaperona y también opcionalmente la información genética de una secuencia de unión peptídica apropiada. La *E. coli* es un huésped preferido para la producción a gran escala de tal proteína de fusión recombinante.

En un modo de realización preferido, la presente invención muestra un complejo soluble que comprende un A β y una chaperona seleccionada de la clase de chaperonas peptidil-prolil isomerasa. Más preferiblemente, la parte del polipéptido recombinante de la chaperona PPI carece del péptido de señal de exportación (de la molécula precursora correspondiente) y corresponde a la chaperona PPI madura. Ya que en este modo de realización preferido la proteína recombinante carece de una secuencia señal funcional, el producto del gen se acumula en el citosol bacteriano.

Una característica llamativa del A β comprendido, p. ej., en un SlyD-AB producido mediante recombinación es su solubilidad excepcional en comparación con el A β "sin chaperona". Es interesante que el "material caotrópico" (es decir SlyD-A β en Cloruro de guanidina 6,0-7,0 M) pueda plegarse de diferentes maneras, que produzcan todas ellas una forma similar a la nativa soluble y termodinámicamente estable. El plegamiento se consigue a alto rendimiento mediante diálisis y dilución rápida, así como mediante cromatografía de exclusión por tamaño renaturalizante o por plegamiento asistido por matriz. Estos hallazgos sugieren que en esta forma con enlaces covalente, el polipéptido de fusión AB-SlyD es una proteína más termodinámicamente estable que metaestable.

El polipéptido recombinante SlyD-A β comprende dos dominios de proteínas con requisitos de plegamiento diferentes. Ya que el protocolo de purificación incluye un paso de desnaturalización inicial, es imprescindible que el plegamiento de la chaperona sea reversible. De hecho, existen datos procedentes de métodos espectroscópicos del desplegamiento reversible y plegamiento de SlyD y A β en el complejo proteico unido mediante enlaces covalentes.

Se prefiere también un polipéptido recombinante que sea soluble al menos en 100 nM en una solución que tiene un pH de 7,4 y está compuesta por fosfato sódico 20 mM y cloruro sódico 150 mM, que comprende un A β , un péptido de unión y una chaperona peptidil-prolil isomerasa.

La secuencia del péptido de unión de este polipéptido recombinante se selecciona para asegurar una asociación intramolecular óptima del A β y el dominio chaperona utilizado. Preferiblemente, esta secuencia de unión es de unos 20 aminoácidos de longitud aproximadamente y comprende aminoácidos que proporcionan flexibilidad y solubilidad, como por ejemplo, glicina y serina. Preferiblemente la secuencia de unión es de 10 a 50 aminoácidos de longitud. Más
 5 preferiblemente entre 12 y 40 aminoácidos de longitud y la de elección es la secuencia de unión que consta de 15 a 35 aminoácidos. El A β y la chaperona están siempre próximos (manteniéndose unidos, p. ej., mediante un conector adecuado). En un modo de realización preferido el polipéptido recombinante consta de FkpA maduro o SlyD truncado (aminoácidos 1-165) unido a su proteína diana vía un conector flexible. Esto, como indican los datos, aporta un efecto estabilizador adicional.

Se ha observado que A β sorprendentemente, como parte del complejo intramolecular entre la chaperona PPI y A β , es soluble y estable. La mejora en la estabilidad de A β en tal complejo aporta ventajas adicionales. Por ejemplo, es posible de obtener muy fácilmente una molécula recombinante A β -chaperona completamente renaturalizada. La proteína recombinante se solubiliza inicialmente mediante un tratamiento con agentes caotrópicos (p. ej., cloruro de guanidina). Puede obtenerse una proteína completamente renaturalizada que comprende los dominios para proteínas
 15 unidos covalentemente simplemente mediante el paso del material solubilizado a través de una columna de filtración en gel, equilibrada con una solución tampón fisiológica adecuada.

El plegamiento asistido por matriz puede aplicarse también fácilmente y de manera muy ventajosa, véase el Ejemplo 2 y la Figura 2. En ellos se muestra que con un paso de renaturalización adecuado y una purificación fácil se obtiene una proteína de fusión SlyD-SlyD-A β soluble con una pureza del 90% aproximadamente.

Es una característica muy importante del complejo, de acuerdo con la presente invención, que el A β en tal complejo A β esté presente en forma soluble en condiciones fisiológicas de pH, p. ej., a pH 7,4 en un tampón formado por fosfato 20 mM y cloruro sódico 150 mM. De modo distinto al A β libre el A β que forma tal complejo no se adhiere o presenta predisposición hacia la agregación. Esta es una ventaja enorme en las aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. En un modo de realización preferido, la presente invención hace referencia a una composición de reactivos que es soluble en condiciones fisiológicas de pH, que comprende un complejo intramolecular formado por un péptido A β y una chaperona seleccionada de la clase de chaperonas peptidil-prolil isomerasa.

Un complejo soluble que comprende A β con estructura plegada similar a la nativa y una chaperona seleccionada de la clase de chaperonas peptidil-prolil isomerasa representa un modo de realización muy preferido de la presente invención.

En lo referente a la inmunización con A β , es bastante obvio el progreso realizado al proporcionar un A β “soluble y similar al nativo”. Por primera vez se encuentra disponible un A β soluble y similar al nativo en condiciones fisiológicas de pH.

En un modo de realización preferido, el complejo soluble como se ha descrito se utiliza para producir una composición de reactivos para su uso en forma de medicamento. La composición de reactivos comprende el complejo A β -chaperona junto con excipientes aceptables fisiológicamente y si es necesario aditivos adecuados y/o sustancias auxiliares convencionales.

Otro modo de realización preferido, de acuerdo con la presente invención, está representado por la formación de una composición de reactivos que comprende un complejo A β -chaperona y el uso de tal composición para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero. El complejo descrito tiene disponibles muchos más epítomos A β que cualquier otro inmunógeno A β conocido. Por lo tanto se espera que el nuevo inmunógeno induzca una respuesta inmunitaria mucho mayor.

Con respecto a los procedimientos diagnósticos las ventajas evidentes de los complejo A β -chaperona solubles de acuerdo con la presente invención son, p. ej., el aumento de estabilidad de un péptido A β , en condiciones fisiológicas de pH, y/o el aumento de la sensibilidad en el diagnóstico, y/o el aumento de la cantidad de epítomos conformacionales presentes y/o la posibilidad de marcar fácilmente el complejo A β -chaperona.

En lo que al marcado se refiere, el modo y la estrategia utilizada en el acoplamiento químico puede ahora seleccionarse según sea necesario. En el caso de los polipéptidos, están disponibles técnicas químicas de acoplamiento dirigidas hacia los residuos -SH, -NH₂ o -COO⁻ así como el grupo -OH de la tirosina, el grupo imidazol de la histidina, o los grupos imino heterocíclicos del triptófano. Se conocen varias técnicas químicas de acoplamiento adecuadas para cada uno de estos grupos funcionales (Aslam, M. and Dent, A., *supra*). Las técnicas químicas rutinarias de acoplamiento de proteínas requieren que la proteína sea soluble en las condiciones de pH en las que se trabaja, p. ej., dentro de un intervalo de pH de 5 a 8,5 aproximadamente.

Los grupos marcadores o grupos efectores como los grupos de unión a fase sólida son marcages bien conocidos. Un complejo A β -chaperona soluble marcado representa otro modo de realización preferido de acuerdo con la presente invención.

El grupo marcador puede seleccionarse entre cualquier grupo marcador detectable conocido, tales como los colorantes, grupos marcadores luminescentes, como los grupos quimioluminiscentes, p. ej., ésteres de acridina o dioxeta-

nos, o colorantes fluorescentes, p. ej., fluoresceína, cumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de éstos. Otros ejemplos de grupos marcadores son los complejos metálicos luminiscentes, como el rutenio o complejos de europio, enzimas, p. ej., como los que se utilizan en el ELISA o en CEDIA (inmunoanálisis donador con una enzima clonada, p. ej., EP-A-0 061888) y radioisótopos.

Los grupos efectores comprenden, por ejemplo, una de las dos partes que forman una pareja que se une gracias a que presentan afinidad biológica. Al realizar un ensayo, el grupo efector interacciona específicamente y preferiblemente de modo no covalente con la otra parte que forma la pareja de unión afín biológicamente. Los ejemplos de parejas de unión adecuadas son los haptenos o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de la biotina como la aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, sacarosa/lecitina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario y receptor/ligando, p. ej., receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea. Las parejas de unión preferidas comprenden los haptenos, antígenos y hormonas. Los haptenos como la digoxina y biotina y los análogos de éstos son especialmente preferidos.

Los expertos en la materia conocen bien los inmunoanálisis. Los métodos para realizar tales ensayos, así como las aplicaciones prácticas y los procedimientos aparecen resumidos en los libros de texto relacionados. Ejemplos de estos libros de texto son Tijssen, P., *Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates*, en: "Practice and theory of enzyme immunoassays", eds. R.H. Burdon y v. P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam (1990), pp. 221-278) y varios volúmenes de "Methods in Enzymology", eds. S.P. Colowick, N.O. Caplan, Academic Press (1980)), los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121 tratan especialmente los métodos de detección inmunológicos.

La presente invención revela el uso de un complejo chaperona-A β soluble en un inmunoanálisis. El complejo soluble que comprende A β y una chaperona PPI se usa preferiblemente como material estándar en un inmunoanálisis para la detección del péptido A β . En otro modo de realización preferido, un complejo soluble marcado que comprende A β y una chaperona PPI se utiliza en un inmunoanálisis para la detección de anticuerpos contra A β .

El nuevo complejo chaperona-A β proporciona la posibilidad de separar la chaperona de tal complejo y no requiere la modificación del antígeno (A β). Generalmente, se acepta que la modificación de un polipéptido con una segunda fracción química, por ejemplo, el acoplamiento de un marcador a esa molécula, incluye el riesgo de que afecte negativamente al polipéptido. Por ejemplo, el epítipo que se investiga puede estar afectado, o este marcado puede causar una unión no específica. De acuerdo con la presente invención, es posible ahora derivar específicamente la chaperona hacia un complejo chaperona-A β .

Los reactivos de las técnicas de diagnóstico en el campo de los ensayos de unión específica, como los inmunoanálisis, normalmente se obtienen mejor en forma de un equipo, que contiene el agente o agentes de unión específica y los reactivos auxiliares necesarios para realizar el ensayo. Consecuentemente, la presente invención hace referencia también a un equipo inmunológico que comprende al menos una composición de reactivos que contiene un complejo A β -chaperona, de acuerdo con la presente invención y reactivos auxiliares para realizar una determinación respecto a A β . Preferiblemente la composición de reactivos que comprende el complejo A β -chaperona se obtiene en forma líquida.

En otro modo de realización, un complejo soluble que comprende A β y una chaperona PPI pueden utilizarse también para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto, tal como un ser humano o un animal. Los complejos solubles pueden administrarse a un sujeto en forma de composiciones, tales como aquellas que pueden contener un excipiente o vehículo. Tales composiciones pueden incluir también un adyuvante. Ejemplos de adyuvantes convencionales incluyen, aunque no se limitan a éstos, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, Merck 65, AS-2, alumbre, fosfato de aluminio, geles minerales como el hidróxido de aluminio y sustancias activas en la superficie como la lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. Otros adyuvantes útiles incluyen, aunque no se limitan a éstos, polisacáridos de la cápsula bacteriana, dextrano, IL-12, GM-CSF, ligando CD40, IFN- γ e IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, IL-18 o cualquier citocina o fragmento de DNA bacteriano.

Puede administrarse una dosis (administración) de una composición que contenga un complejo soluble. Sin embargo, después de la primera administración se puede continuar con una dosis de recuerdo, en una, dos, tres veces o más. El número de dosis administradas a un sujeto depende en parte de la respuesta del sujeto a la composición que contiene el complejo soluble. Un número de dosis adecuado incluye cualquier número necesario para inmunizar a un animal contra el complejo soluble.

Una segunda administración (recuerdo) de la composición que contiene el complejo soluble puede administrarse entre los 7 días y 1 año aproximadamente después de la primera administración. El periodo de tiempo entre la primera y la segunda administración puede oscilar entre los 14 días hasta los 6 meses, 21 días y 3 meses, frecuentemente entre aproximadamente los 28 días y los 2 meses después de la administración inicial. Una tercera administración (segunda dosis de recuerdo) puede administrarse entre aproximadamente entre los 14 días y los 10 años después de la primera administración, p. ej., entre aproximadamente los 14 días y los 3 años, frecuentemente entre aproximadamente los 21 días y un 1 año, muy frecuentemente entre aproximadamente los 28 días y los 6 meses después de la primera administración. Las dosis de recuerdo posteriores pueden administrarse en intervalos de 2 semanas o 1 mes, 3 meses o 6 meses hasta intervalos de 10 años.

Normalmente, se administrará la cantidad de complejo soluble a un sujeto que sea suficiente para inmunizar un animal contra un antígeno (es decir, “una dosis efectiva desde el punto de vista inmunológico” o “una dosis efectiva desde el punto de vista terapéutico”). Una cantidad adecuada para lograr “una dosis efectiva desde el punto de vista inmunológico” dependerá en parte del peso y del estado de la salud general del paciente y el juicio del médico que prescribe u otro personal cualificado.

La dosis efectiva del complejo soluble se puede formular en los modelos animales para alcanzar una inducción de una repuesta inmunitaria; tales datos se pueden utilizar para optimizar fácilmente la administración en los seres humanos en base a los datos en animales. Normalmente, una dosis estará entre aproximadamente 1 fg y aproximadamente 100 µg, frecuentemente entre aproximadamente 1 pg y aproximadamente 100 µg, más frecuentemente entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 50 µg y generalmente entre aproximadamente 100 ng y aproximadamente 50 µg. En algunos modos de de realización, la dosis oscila entre aproximadamente 1 fg y aproximadamente 100 µg por kg de peso del sujeto, frecuentemente entre aproximadamente 1 pg y aproximadamente 100 µg, más frecuentemente entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 50 µg, y generalmente entre aproximadamente 100 ng y aproximadamente 50 µg por kg de peso del sujeto.

Las composiciones que contienen el complejo soluble de la invención se pueden administrar por diferentes vías y en varias formas. Una composición compleja soluble puede incluir los vehículos y los excipientes, tales como tampones, los carbohidratos, manitol, las proteínas, los polipéptidos o los aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, bacterioestáticos, quelantes, agentes de suspensión, espesantes y/o conservantes; agua, aceites, soluciones salinas, soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, otras sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según lo necesario para la aproximación a condiciones fisiológicas, tales como neutralizantes, agentes para el ajuste de la tonicidad, humectantes, etc... Se puede también incorporar un coadyuvante convencional en la composición.

Aunque se puede utilizar cualquier vehículo conveniente para administrar las composiciones de la invención, el tipo de vehículo variará dependiendo de la forma de administración. Los compuestos se pueden también encapsular dentro de liposomas. Las microesferas biodegradables son convenientes en algunos casos como vehículos; por ejemplo, como los que se describen en la patente estadounidense número 5 942 252.

La esterilización de las composiciones es conveniente, como las que se consiguen por ejemplo mediante técnicas convencionales, tales como filtración estéril. Las soluciones acuosas que resultan se pueden acondicionar en envases para su uso directamente o se pueden liofilizar.

Las composiciones que contienen el complejo soluble de la invención se pueden administrar por diferentes vías, que incluyen inyección (e.g., intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal), inhalación, administración tópica, supositorios, mediante el uso de parches transdérmicos o por vía oral.

Cuando la administración es mediante inyección, las composiciones se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en soluciones tampón fisiológicas, tales como la solución de Hanks, la solución de Ringer, solución tampón formada por fosfato 20 mM y cloruro sódico 150 mM (pH 7,4) o en una solución tampón salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la composición puede presentarse en la forma del polvo para su reconstitución con un vehículo conveniente antes de su uso, e.g., agua apirógena estéril. Las composiciones que se administran por inhalación pueden presentarse en forma de aerosol en envases presurizados o como nebulizador en los que se emplea un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de los aerosoles a presión, la dosis unitaria puede proporcionarse gracias al uso de una válvula que libere una dosis exacta. Las cápsulas y los cartuchos de, p. ej., gelatina, para su uso en un inhalador o un insuflador se pueden formular con una mezcla del polvo de proteínas y una base adecuada para el polvo, tal como la lactosa o el almidón. Para la administración tópica, las composiciones se pueden formular como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones y similares y se conocen bien en la materia. En algunos modos de realización, la administración se efectúa mediante un parche transdérmico. Las composiciones en supositorios se pueden formular con bases convencionales para su elaboración.

Cuando la administración es oral, una composición se puede formular fácilmente al combinar la composición con excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes sólidos incluyen el manitol, la lactosa, el estearato del magnesio, etc.; tales excipientes permiten la formación de los comprimidos, de las píldoras, de las grageas, de las cápsulas, de los líquidos, de los geles, de los jarabes, de las mezclas, de las suspensiones etc., para ingestión. Tales formulaciones pueden ser polvos, cápsulas y comprimidos; los excipientes adecuados incluyen rellenos compuestos de azúcares, preparaciones de celulosa, agentes de granulación y agentes aglutinantes.

Los métodos para la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales, que incluyen los fragmentos de unión (e.j., F(ab)2) y las versiones de cadena simple son bien conocidas. Sin embargo, muchos antígenos son incapaces de provocar una respuesta adecuada de los anticuerpos. En un modo de realización, una composición que contiene un complejo soluble de la invención y un antígeno se administra a un animal, que provoca de este modo una respuesta inmunitaria en el animal. Los anticuerpos policlonales y monoclonales se preparan posteriormente mediante técnicas estándar.

Los ejemplos, las referencias, el listado de la secuencia y las figuras siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance verdadero de la cual se expone en las reivindicaciones adjuntas.

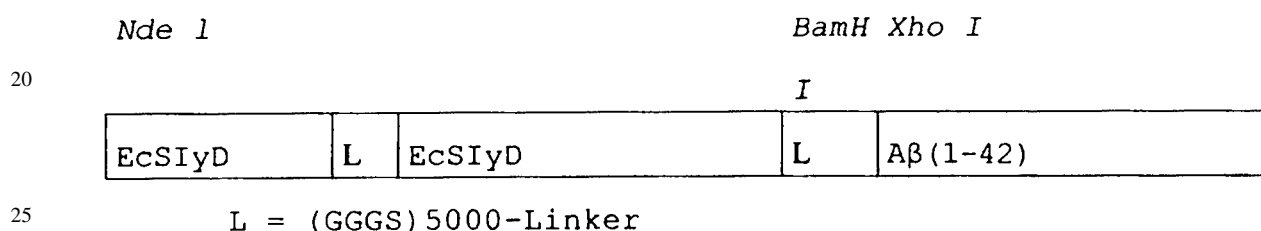
Ejemplos

Ejemplo 1

5 Construcción de un vector de expresión SS-A β (1-42)

El gen que codifica la chaperona SlyD se ha aislado mediante procedimientos de clonación rutinarios a partir del cromosoma de *E. coli* (*Ec*). Para su expresión mediante recombinación se ha generado una construcción de DNA que codifica para los aminoácidos del 1 al 165 de SlyD (= EcSlyD). Se ha construido un vector de expresión que 10 comprende dos veces EcSlyD(1-165) (=SS) como pareja de fusión y $\Delta\beta$ (1-42) como proteína diana.

Los siguientes pasos de clonación se realizaron en base al plásmido de expresión pET24a de Novagen (Madison, WI, EUA). El vector se digirió con NdeI y XhoI y se insertó un casete semisintético que comprende el tándem EcSlyD y Aβ(1-42):



El inserto del plásmido resultante se secuenció y se observó que codificaba la proteína de fusión deseada.

30 La secuencia de ácido nucleico del casete que se insertó (= SEO ID NO:1) se muestra a continuación.

35 CATATGAAAGTAGCAAAAGACCTGGTGGTCAGCCTGGCCTATCAGGTACGT
ACAGAAGACGGTGTGTTGGTTGATGAGTCTCCGGTGAGTGCGCCGCTGGA
CTACCTGCATGGTCACGGTTCCCTGATCTCTGGCCTGGAAACGGCGCTGGA
40 AGGTCATGAAGTTGGCGACAAATTTGATGTCGCTGTTGGCGGAACGACGC
TTACGGTCAGTACGACGAAA.ACCTGGTGCAACGTGTTCCCTAAAGACGTATT
45 TATGGGCGTTGATGAACTGCAGGTAGGTATGCGTTTCCTGGCTGAAACCGA
CCAGGGTCCGGTACCGGTTGAAATCACTGCGGTTGAAGACGATCACGTCG
50 TGGTTGATGGTAACCACATGCTGGCCGGTCAGAACCTGAAATTCAACGTTG
AAGTTGTGGCGATTGCGGAAGCGACTGAAGAAGAACTGGCTCATGGTCAC
55 GTTCACGGCGCGCACGATCACCACCACGATCACGACCACGACGGTGGCGG
TTCCGGCGGTGGCTCTGGTGGCGGAAGCGGTGGCGGTTCCGGCGGTGGCT
60 CTGGTGGCGGTAAAGTAGCAAAAGACCTGGTGGTCAGCCTGGCCTATCAG

ES 2 294 196 T3

GTACGTACAGAAGACGGTGTGTTGGTTGATGAGTCTCCGGTGAGTGCGCC
 GCTGGACTACCTGCATGGTCACGGTTCCTGATCTCTGGCCTGGAAACGGC
 5 GCTGGAAGGTCATGAAGTTGGCGACAAATTTGATGTCGCTGTTGGCGCGAA
 CGACGCTTACGGTCAGTACGACGAAAACCTGGTGCAACGTGTTCTTAAAGA
 10 CGTATTTATGGGCGTTGATGAACTGCAGGTAGGTATGCGTTTCCTGGCTGA
 AACCGACCAGGGTCCGGTACCGGTTGAAATCACTGCGGTTGAAGACGATC
 15 ACGTCGTGGTTGATGGTAACCACATGCTGGCCGGTCAGAACCTGAAATTCA
 ACGTTGAAGTTGTGGCGATTTCGCGAAGCGACTGAAGAAGAACTGGCTCAT
 20 GGTCACGTTACGCGCGCACGATCACCACCACGATCACGACCACGACGG
 TGGCGGTTCCGGCGGTGGCTCTGGTGGCGGATCCGGTGGCGGTTCCGGCG
 25 GTGGCTCTGGTGGCGGTGACGCTGAATTCCGTCACGACTCCGGTTACGAA
 GTTCACCACCAGAACTGGTTTTCTTCGCTGAAGACGTTGGTTCCAACAAA
 30 GGTGCTATCATCGGTCTGATGGTTGGTGGTGTGTTATCGCTCTCGAGCAC
 CACCACCACCACCACTGA

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión que resulta (=SEQ ID NO:2) se proporciona a continuación:

1	MK	VA	KL	LV	VS	LAY	QV	RT	ED	G	VL	VE	SP	VS	PL	DY	LH	GH	GS	LIS	GLE	TA	LE	TA	LE
51	GHE	VG	DK	FD	VD	AV	GA	ND	AY	GQ	YD	EN	LV	QR	VP	KD	VF	MG	VD	EL	QV	GM	RF	LA	ET
101	DQ	GP	VP	VE	IT	AVE	DD	HV	VV	VD	GN	HL	AG	QN	LN	KF	NE	VE	VA	IR	EATE	EEL	LA	HG	
151	HV	HA	HD	HH		DHD	HD	GG	GS	G	GG	SG	GS	GG	G	SG	GG	SG	GG	KV	AK	DL	VV	SL	AY
201	QV	RT	ED	GV	LV	DE	SP	VS	AP	LD	YL	HG	HS	LI	SL	IS				GLE	TA	LE	GHE		
251	AN	DA	YG	QY	DE	NL	VQ	RV	PK	DV	FM	GV	DE	LQ	VG	MR	FL	AE	TQ	Q	PVP	VE	IT	AVE	
301	DD	HV	VV	VD	GN	HL	AG	QN	LK	FN	VE	VV	AI	RE	AT	EE	EL	AH	GH	VH	GA	HD	HH	HD	
351	HD	GG	GS	GG	GS	GG	SG	GG	SG	G	SG	GG	DA	EF	FR	HD	SG	YE	VH	HQ	KL	VF	FA	ED	VG
401	SN	KG	AI	IG	LM	VG	GV	VI	AL	EH	HH	HH	HH												

Ejemplo 2

Producción y purificación de la proteína de fusión SS-A β (1-42)

5 Las células *E. coli* BL21(DE3) que albergan el plásmido de expresión se cultivaron en medio LB con la adición de canamicina con una OD₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm) de 1 y se indujo la sobreexpresión en el citosol mediante la adición de isopropil- β -D-tiogalactosido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM en una temperatura de 37°C durante el crecimiento. Tras cuatro horas a partir de la inducción, se recogieron las células mediante centrifugación (20 min a 5000 x g), se congelaron y se almacenaron a -20°C. Para la lisis celular, el sedimento congelado se resuspendió en 10 Tris/HCl 50 mM a pH 8,5 y hidrocloreuro de guanidina 7,0 M, imidazol 5 mM a temperatura ambiente y la suspensión resultante se sometió además al tratamiento con un homogenizador Polytronic® PT3100 (Kinematica). Después de la centrifugación (20000 x g, 4°C, 30 min) y la filtración, el lisado se aplicó en una columna de Ni-NTA (niquel-nitrilotriacetato) equilibrada previamente en el tampón de lisis ya mencionado.

15 Después de un paso de lavado en exceso (>20 volúmenes de columna de tampón de lisis), el tampón de lisis caotrópico se reemplazó con fosfato sódico 50 mM a pH 7,8 y cloruro sódico 100 mM para permitir que la proteína unida a la matriz se plegara. Al menos se aplicaron 10 volúmenes de columna de solución tampón para el plegamiento para evitar una concentración de hidrocloreuro de guanidina caotrópica o que interfiriera. Finalmente, la proteína de fusión nativa se eluyó al aplicar un gradiente de imidazol de 5 mM a 500 mM en fosfato sódico 50 mM a pH 7,8 y 20 cloruro sódico 100 mM. Se evaluó la pureza de las fracciones con contenido en proteínas mediante una electroforesis con dodecil sulfato sódico y un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se mezclaron.

De modo sorprendente, SS-A β (1-42) eluye en forma de proteína soluble. A pesar de que la A β (1-42) es notoriamente hidrófoba, el espectro UV de la proteína de fusión producida de manera recombinante con un plegamiento en la 25 matriz no indica ninguna tendencia hacia la formación de agregados. Como se muestra en la Fig. 1, los valores basales del espectro de absorción UV de SS-A β en condiciones fisiológicas de pH casi equivalen a la abscisa (por encima de 310 nm) e indican de este modo que no existen partículas que desvíen la luz que resulta debido a fenómenos de auto-asociación o agregación. De hecho, la forma del espectro representado en la Fig. 1 sugiere un polipéptido de fusión soluble y fácil de manipular que comprende el péptido A β (1-42) que debería ser útil como herramienta de diagnóstico 30 (p. ej. como estándar en un inmunoanálisis de A β) o como inmunógeno.

En resumen, el método descrito en este documento facilita la producción adecuada mediante recombinación de A β en forma soluble y en grandes cantidades (rendimiento > 20 mg proteína de fusión/g de peso húmedo de masa de 35 células *E. coli*). La proteína de fusión SS-A β (1-42) eluye con aproximadamente 150 mM de imidazol de la columna Ni-NTA. La pureza de las fracciones mezcladas que contienen la proteína de fusión se analizaron mediante una electroforesis con dodecil sulfato sódico y un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Como muestra la SDS-PAGE la pureza del polipéptido de fusión como se obtiene en un paso único combinado de purificación y renaturalización excede el 90% tras aplicar un protocolo de cromatografía en un paso (cf. Figura 2).

40 **Listado de referencias**

- Aslam, M. y Dent, A.**, The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation", eds. M. Aslam y A. Dent, *McMillan Reference*, London (1998), pp. 216-363
- 45 **Braden, B.C., and Poljak, R.J.**, *Faseb J.* 9 (1995) 9-16
- Crooke, E., and Wickner, W.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 5216-5220 **Danese, P.N., et al.**, *Genes Dev.* 9 (1995) 387-398
- 50 **Dartigalongue, C., and Raina, S.**, *Embo J.* 17 (1998) 3968-3980
- Egan, D. A., et al.**, *Biochemistry* 32 (1993) 1920-1927
- EP-A-0 061888
- 55 **Fischer, G., et al.**, *Nature* 337 (1989) 476-478
- Glenner, G.G., and Wong, C.W.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 (1984) 885-890 **Glenner, G.G., and Wong, C.W.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122 (1984) 1131-1135 **Hottenrott, S., et al.**, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15697-15701
- 60 **Iwatsubo, T., et al.**, *Neuron* 13 (1994) 45-53
- Kang, J., et al.**, *Nature* 325 (1987) 733-736
- 65 **Kay, J. E.**, *Biochem J.* 314 (1996) 361-385
- Lane, W.S., et al.**, *J. Protein Chem.* 10 (1991) 151-160

ES 2 294 196 T3

Masters, C.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 4245-4249

Rahfeld, J.U., et al., *FEBS Lett.* 352 (1994) 180-184

5 **Ramm, K., and Pluckthun, A.,** *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17106-17113

Roher, A.E., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 10836-10840

10 **Schmid, F. X.,** Molecular chaperones in the life cycle of proteins, eds. A.L. Fink and Y. Goto, *Marcel Decker Inc.*, New York (1998), pp. 361-389

Scholz, C., et al., *Embo J.* 16 (1997) 54-58

15 **Scholz, C., et al.,** *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12703-12707

Selkoe, D.J., et al., *J. Neurochem.* 46 (1986) 1820-1834

20 **Selkoe, D.J.,** *J. Neuropath. and Exp. Neurol.* 53 (1994) 438-447 **Selkoe, D.J.,** *Neuron* 6 (1991) 487 **Stoller, G., et al.,** *Embo J.* 14 (1995) 4939-4948

SWISS-PROT, accession number P 45523

Tijssen, In: "Methods in Enzymology", eds. S.P. Colowick, N.O. Caplan, *Academic Press* (1980)

25 **Tijssen, P.,** Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates, In: "Practice and theory of enzyme immunoassays", eds. R.H. Burdon y v. P.H. Knippenberg, *Elsevier*, Amsterdam (1990), pp. 221-278 US Patent 5,942,252

WO 98/13496

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de producción de un polipéptido de fusión recombinante soluble que comprende un A β y una FKBP que poseen actividad chaperona y que incluye:
- la solubilización de dicho polipéptido,
- y el ajuste de la solución tampón hasta condiciones fisiológicas,
- 10 en el que el complejo A β -chaperona formado es al menos soluble en 100 nM, como se determina en una solución que posee un pH de 7,4 y está formada por fosfato sódico 20 mM y cloruro sódico 150 mM.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la FKBP que posee actividad chaperona se selecciona del grupo formado por SlyD, FkpA y el factor desencadenante.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la chaperona FKBP es SlyD.
- 20 4. Un polipéptido de fusión recombinante que es soluble al menos en 100 nM en una solución que posee un pH de 7,4 y está formada por fosfato sódico 20 mM y cloruro sódico 150 mM, que comprende:
- un A β y una FKBP que posee actividad chaperona.
- 25 5. Un polipéptido de fusión recombinante que es soluble al menos en 100 nM en una solución que posee un pH de 7,4 y está formada por fosfato sódico 20 mM y cloruro sódico 150 mM, que comprende:
- un A β ,
- un péptido de unión y
- 30 FKBP con actividad chaperona.
- 35 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el polipéptido de fusión recombinante soluble de acuerdo con la reivindicación 4 o el polipéptido recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el péptido A β se selecciona del grupo formado por A β (1-40), A β (1-42) y A β (1-43).
7. El uso de un polipéptido de fusión recombinante A β -chaperona de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5 en un inmunoanálisis.
- 40 8. Un equipo que comprende al menos una composición de reactivos que comprende un polipéptido de fusión recombinante soluble de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5 y reactivos auxiliares para realizar una determinación cuantitativa de A β .

figura 1

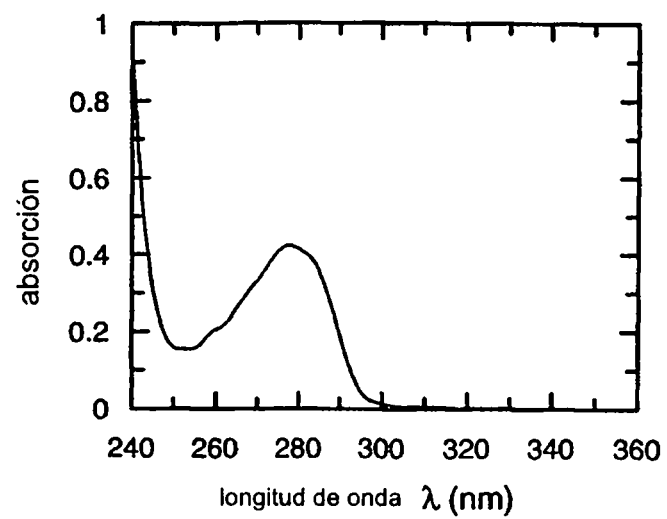
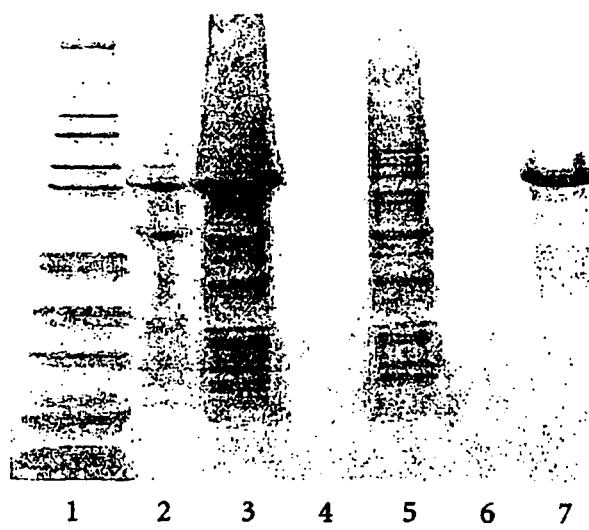


Figure 2



ES 2 294 196 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> complejos solubles de proteínas diana y chaperonas peptidil-prolil isomerasas y métodos para su producción y uso

<130> 21547 WO

<140>

10 <141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1281

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial :codifica para una protein de fusión

<220>

25 <221> CDS

<222> (4)..(1278)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 294 196 T3

<400> 1

cat atg aaa gta gca aaa gac ctg gtg gtc agc ctg gcc tat cag
5 gta

48

Met Lis Val Ala Lis Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tir Gin Val
10 1 5 10 15

15

cgt aca gaa gac ggt gtg ttg gtt gat gag tct ccg gtg agt gcg
ccg 96

20

Arg Tre Glu Asp Gli Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala
Pro

25 20 25 30

30

ctg gac tac ctg cat ggt cac ggt tcc ctg atc tct ggc ctg gaa
acg 144

35

Leu Asp Tir Leu His Gli His Gli Ser Leu Ile Ser Gli Leu Glu Thr
35 40 45

40

gcg ctg gaa ggt cat gaa gtt ggc gac aaa ttt gat gtc gct gtt
ggc 192

45

Ala Leu Glu Gli His Glu Val Gli Asp Lis Fen Asp Val Ala Val
Gli 50 55 60

50

gcg aac gac gct tac ggt cag tac gac gaa aac ctg gtg caa cgt
gtt

55

240

Ala Asn Asp Ala Tir Gli Gln Tir Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg
60 Val 65 70 75

65

cct aaa gac gta ttt atg ggc gtt gat gaa ctg cag gta ggt atg

ES 2 294 196 T3

cgt
288
5 Pro Lis Asp Val Fen Met Gli Val Asp Glu Leu Gln Val Gli Met
Arg 80 85 90 95
10
ttc ctg gct gaa acc gac cag ggt ccg gta ccg gtt gaa atc act
15 gcg 336
Phe Leu Ala Glu Tre Asp Gln Gli Pro Val Pro Val Glu Ile Tre
20 Ala 100 105 110
25 gtt gaa gac gat cac gtc gtg gtt gat ggt aac cac atg ctg gcc
ggt 384
30 Val Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gli Asn His Met
Leu Ala Gli 115 120 125
35
cag aac ctg aaa ttc aac gtt gaa gtt gtg gcg att cgc gaa gcg
act 432
40 Gln Asn Leu Lis Fen Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala
Tre 130 135 140
45
gaa gaa gaa ctg gct cat ggt cac gtt cac ggc gcg cac gat cac
50 cac 480
Glu Glu Glu Leu Ala His Gli His Val His Gli Ala His Asp
55 His His 145 150 155
60
cac gat cac gac cac gac ggt ggc ggt tcc ggc ggt ggc tct ggt
ggc 528
65 His Asp His Asp His Asp Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Ser Gli

ES 2 294 196 T3

Gli 160 165 170 175
 5 gga agc ggt ggc ggt tcc ggc ggt ggc tct ggt ggc ggt aaa gta
 gca 576
 10 Gly Ser Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Lis Val
 Ala 180 185 190
 15 aaa gac ctg gtg gtc agc ctg gcc tat cag gta cgt aca gaa gac
 20 ggt 624
 Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tir Gln Val Arg Tre Glu Asp
 25 Gli 195 200 205
 30 gtg ttg gtt gat gag tct ccg gtg agt gcg ccg ctg gac tac ctg
 cat 672
 Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tir Leu
 35 His 210 215 220
 40 ggt cac ggt tcc ctg atc tct ggc ctg gaa acg gcg ctg gaa ggt
 cat 720
 45 Gly His Gli Ser Leu Ile Ser Gli Leu Glu Tre Ala Leu Glu Gli
 His 225 230 235
 50 gaa gtt ggc gac aaa ttt gat gtc gct gtt ggc gcg aac gac gct
 55 tac 768
 Glu Val Gli Asp Lis Fen Asp Val Ala Val Gli Ala Asn Asp Ala
 60 Tir 240 245 250 255
 65 ggt cag tac gac gaa aac ctg gtg caa cgt gtt cct aaa gac gta

ES 2 294 196 T3

ttt 816

5 Gly Gln Tir Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lis Asp Val
Fen 260 265 270

10 atg ggc gtt gat gaa ctg cag gta ggt atg cgt ttc ctg gct
gaa acc 864

15 Met Gli Val Asp Glu Leu Gln Val Gli Met Arg Fen Leu Ala
Glu Tre 275 280 285

20 gac cag ggt ccg gta ccg gtt gaa atc act gcg gtt gaa gac gat
cac 912

25 Asp Gln Gli Pro Val Pro Val Glu Ile Tre Ala Val Glu Asp Asp
His 290 295 300

30 gtc gtg gtt gat ggt aac cac atg ctg gcc ggt cag aac ctg aaa
ttc 960

35 Val Val Val Asp Gli Asn His Met Leu Ala Gli Gln Asn Leu
Lis Fen 305 310 315

45 aac gtt gaa gtt gtg gcg att cgc gaa gcg act gaa gaa gaa ctg
gct 1008

50 Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Tre Glu Glu Glu
Leu Ala .320 325 330 335

55 cat ggt cac gtt cac ggc gcg cac gat cac cac cac gat cac gac
cac 1056

60 His Gli His Val His Gli Ala His Asp His His His Asp His
Asp His 340 345 350

65

ES 2 294 196 T3

```

    gac ggt ggc ggt tcc ggc          ggt ggc tct ggt ggc gga tcc
ggt ggc ggt 1104
5      Asp Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Ser Gli
Gli Gli 355                      360                      365
10
    tcc ggc ggt ggc tct ggt ggc ggt gac gct gaa ttc cgt cac gac
15 tcc 1152
    Ser Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Asp Ala Glu Fen Arg His
20 Asp Ser 370                      375                      380
    ggt tac gaa gtt cac cac cag aaa ctg gtt ttc ttc gct gaa gac
25 gtt 1200
    Gly Tir Glu Val His His Gln Lis Leu Val Fen Phe Ala Glu Asp
30 Val 385                      390                      395
    ggt tcc aac aaa ggt gct atc atc ggt ctg atg gtt ggt ggt gtt
35 gtt 1248
    Gly Ser Asn Lis Gli Ala Ile Ile Gli Leu Met Val Gli Gli Val
40 Val 400                      405                      410                      415
45
    atc gct ctc gag cac cac cac cac cac tga 1281
50 Ile Ala Leu Glu His His His His His His
    420                      425
55 <210> 2
    <211> 425
    <212> PRT
60 <213> Secuencia Artificial
    <223> Descripción de la Secuencia Artificial: codifica para una proteína de fusión
65

```


ES 2 294 196 T3

<400> 2

5 Met Lis Val Ala Lis Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tir Gin Val
Arg 1 5 10 15

10 Tre Glu Asp Gli Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro
Leu 20 25 30

15 Asp Tir Leu His Gli His Gli Ser Leu Ile Ser Gli Leu Glu
20 Tre Ala 35 40 45

25 Leu Glu Gli His Glu Val Gli Asp Lis Fen Asp Val Ala Val
Glu Ala 50 55 60

30 Asn Asp Ala Tir Gli Gln Tir Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val
35 Pro 65 70 75 80

40 Lys Asp Val Fen Met Gli Val Asp Glu Leu Gln Val Gli Met Arg
Fen 85 90 95

45 Leu Ala Glu Tre Asp Gin Gli Pro Val Pro Val Glu Ile Tre Ala
Val 100 105 110

50 Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gli Asn His Met Leu Ala
55 Gli Gln 115 120 125

60

65

ES 2 294 196 T3

5 Asn Leu Lis Fen Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu
 Ala Tre Glu 130 135 140

10 .Glu Glu Leu Ala His Gli His Val His Gli Ala His Asp His
 His His 145 150 155 160

15 Asp His Asp His Asp Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Ser Gli
 Gli Gli 165 170 175

20 Ser Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Lis Val
 25 Ala Lis 180 185 190

30 Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tir Gln Val Arg Tre Glu Asp
 Gli Val 195 200 205

35 Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tir Leu
 40 His Gli 210 215 220

45 His Gli Ser Leu Ile Ser Gli Leu Glu Tre Ala Leu Glu Gli
 His Glu 225 230 235 240

50 Val Gli Asp Lis Fen Asp Val Ala Val Gli Ala Asn Asp Ala
 Tir Gli 245 250 255

55 Gln Tir Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lis Asp Val Fen
 60 Met 260 265 270

65 Gli Val Asp Glu Leu Gln Val Gli Met Arg Fen Leu Ala Glu Tre

ES 2 294 196 T3

Asp 275

280

285

5

Gln Gli Pro Val Pro Val Glu Ile Tre Ala Val Glu Asp Asp

His Val 290

295

300

10

Val Val Asp Gli Asn His Met Leu Ala Gli Gln Asn Leu Lis

15

Fen Asn 305

310

315

320

Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Tre Glu Glu Glu Leu

20

Ala His 325

330

335

25

Gli His Val His Gli Ala His Asp His His His Asp His

Asp His Asp 340

345

350

30

Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Ser Gli

35

Gli Gli Ser 355

360

365

40

Gli Gli Gli Ser Gli Gli Gli Asp Ala Glu Fen Arg His

Asp Ser Gli 370

375

380

45

Tir Glu Val His His Gln Lis Leu Val Fen Phe Ala Glu Asp

Val Gli 385

390

395

50

400

55

Ser Asn Lis Gli Ala Ile Ile Gli Leu Met Val Gli Gli Val

Val Ile 405

410

415

60

Ala Leu Glu His His His His His His

65

420

425