



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 103 749**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>: G01N 33/569

C12N 15/34

C07K 7/00

C12P 21/00

G01N 33/543

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **90916994.8**

⑧⑥ Fecha de presentación : **14.11.90**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 458 918**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **04.12.91**

⑤④ Título: **Método para la obtención de una proteína recombinante y su utilización en la detección del virus de la peste porcina africana (VPPA).**

③⑩ Prioridad: **20.12.89 ES 8904300**

⑦③ Titular/es: **Universidad de Oviedo  
C/ San Francisco, 5  
33003 Oviedo, ES  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:  
**01.10.97**

⑦② Inventor/es: **López Otin, Carlos;  
Pérez Freije, José María y  
Vinuela Díaz, Eladio**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:  
**01.10.97**

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

La Peste Porcina Africana es una enfermedad infecciosa del cerdo doméstico que ha ocasionado unas pérdidas económicas considerables en los últimos treinta años en nuestro país. La falta de una vacuna capaz de inducir una respuesta inmunológica neutralizante hace que la disponibilidad de un método de diagnóstico seguro y eficaz sea una condición indispensable para el control efectivo de la enfermedad. La presente invención trata de proporcionar un medio rápido, sencillo y económico para la detección de la enfermedad.

Los métodos actualmente utilizados en el diagnóstico de la Peste Porcina Africana (ASF) se basan en ensayos inmuno-enzimáticos que utilizan extractos de células infectadas enriquecidos en proteína vírica p72 (C. Vela y col. ES-A- 539611, 1986) como antígeno. Las preparaciones de este tipo están muy contaminadas con proteínas celulares y componentes del medio de cultivo, lo que da lugar a frecuentes errores de diagnóstico y particularmente a falsos positivos. Además, esta forma de obtener el antígeno supone un manejo constante del virus infeccioso, lo que es tan peligroso como antieconómico, ya que requiere costosas instalaciones de seguridad con la correspondiente reducción de la tasa de rendimiento. En opinión de los autores de la presente invención, la selección alternativa más eficaz de un antígeno sería la utilización de la propia proteína p72 en estado purificado y producida con técnicas de ingeniería genética adecuadas. Tomando esta idea como punto de partida, los autores de la invención, después de realizar los correspondientes estudios experimentales, han alcanzado los objetivos antes mencionados que se expresan en los diferentes aspectos de la invención.

La patente US-A- 4 735 800 describe métodos y composiciones para la clonación de genes del Virus de la Fiebre del Valle de Rift en organismos huésped unicelulares así como métodos para el cultivo de los citados organismos unicelulares para obtener productos de gen de Virus de Fiebre del Valle de Rift útiles en la preparación de vacunas frente a Virus de Fiebre del Valle de Rift.

K. Jacobs y col. en "Aislamiento y caracterización de clones genómicos y de ADNc de eritropoyetina humana" (1985) Nature 313 806-810 describen un método para proporcionar una sonda de nucleótidos para eritropoyetina humana así como la preparación de proteína recombinante con él.

Aunque estos dos últimos documentos de técnicas anteriores describen métodos relacionados con la tecnología de ADN recombinante, resultan inadecuados para indicación de las condiciones específicas de aplicación de la citada tecnología en relación con la consecución de un procedimiento fiable de preparación de un método de ensayo del virus de la Peste Porcina Africana (ASFV).

La invención reivindicada se refiere a un procedimiento de preparación de un método de ensayo fiable y seguro, de bajo coste, para Virus de la Peste Porcina Africana (ASFV).

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- (a) purificación de la proteína p72 desde una cápsida viral y obtención de la secuencia parcial de aminoácidos T-P-D-D-P-G-A-M-M-I-T-F
- (b) identificación del gen que codifica la citada proteína por medio de una sonda de oligonucleótidos marcada radiactivamente que contiene una mezcla de oligonucleótidos, cuya secuencia se ha derivado de la secuencia parcial de amino ácidos obtenida en (a) anterior.
- (c) identificación de la secuencia completa de nucleótidos del citado gen.
- (d) expresión del citado gen BL21(DE3) de *E. coli* por medio de un plasmidio pAR3038 con lo que la proteína p72 localizada en el fragmento EcoRIB del genoma del Virus de Peste Porcina Africana se expresa por clonación del mismo en el citado plasmidio para obtener un plasmidio recombinante pS72a, y transformación del citado plasmidio con dicho huésped bacteriano:
- (e) cultivo del citado plasmidio recombinante y purificación de la proteína p72 a partir de los extractos obtenidos.
- (f) unión de la proteína purificada a placas de microvaloración e incubación junto con muestras de suero de cerdo para su ensayo en cuanto a la presencia de anticuerpos frente a Virus de Peste Porcina Africana.

El primer objetivo estaba dirigido a la identificación del gen que codifica proteína p72 de Virus de Peste Porcina Africana (ASFV). Con este fin, la primera etapa implica la purificación de la proteína y la

obtención de secuencias parciales de amino ácidos.

La proteína p72 se purificó por medio de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) de exclusión de tamaños moleculares a partir del virus extracelular obtenido a través de centrifugación de gradiente. El virus (aproximadamente 1 mg de la proteína total) se disolvió en 500  $\mu$ l de agente tampón que contenía acetato de amonio 0,1M, pH 5, B-mercaptoetanol al 5,2% y SDS al 1%. Se calentó a 100°C durante 2 minutos y se cromatografió sobre una columna de HPLC de filtración equilibrada y luego se eluyó con acetato de amonio 0,1 M en presencia de SDS al 0,1%. Se recogieron fracciones de 1,0 ml y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS. Las fracciones que contenían la proteína p72 purificada se digirieron a continuación con tripsina durante 18 horas a 37°C y a una relación enzima/sustrato de 1/50. Los péptidos resultantes se fraccionaron por HPLC de fase inversa en columna equilibrada con ácido trifluoroacético al 0,1% a temperatura ambiente y a una velocidad de flujo constante de 1,5 ml/minuto. Los péptidos purificados se sometieron a degradación secuencial de Edman en presencia de polibreno y utilizando un secuenciador de fase líquido-gas de impulsos. Para la identificación del gen que codifica proteína p72, la sonda utilizada fue una mezcla de oligonucleótidos cuya secuencia había sido derivada de la secuencia parcial de amino ácidos obtenida previamente. Se eligió el heptapéptido correspondiente a los 5-11 amino ácidos del péptido T35 (T-P-D-D-P-G-A-M-M-I-T-F) que mostraba el menor grado de degeneración de codones entre los péptidos secuenciados. A continuación se sintetizó una mezcla de 128 oligonucleótidos que contenía todas las secuencias de codificación posibles de este heptapéptido, pero excluyendo el tercer nucleótido del último codón. Se marcó radiactivamente la sonda con  $^{32}$ P en su extremo 5' mediante polinucleótido T4 quinasa y se hibridó a una mancha de puntos (dot-blot) que contenía suficientes fragmentos de restricción clonados para cubrir el total del genoma vírico. Se obtuvo una hibridación específica en el fragmento EcoRIB. La determinación de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se hizo siguiendo el método de terminador de cadena tal como describe Sanger (PNAS 74, 5463 (1977)). El secuenciado reveló la existencia de un cuadro de lectura abierto único que codifica una proteína que contiene 646 aminoácidos con un peso molecular calculado según lo estimado por movilidad electroforética de la proteína (72 k).

Una vez que la proteína p72 se había identificado y secuenciado, la siguiente tarea consistió en su expresión en *E. coli*. El objetivo aquí perseguido era la obtención de las cantidades máximas del antígeno más parecido a la proteína viral. El sistema utilizado estaba basado en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y el plasmidio pAR3038. BL21(DE3) es una lisógena de un derivado de bacteriófago lambda D69, que contiene el gen de ARN T7 polimerasa bajo el control del promotor lacUV5 inducible por IPTG (Studier y col. *J. Mol. Biol.* 189, 113 (1986)). El plasmidio pAR3038 es un derivado de pBR322 que contiene promotor  $\phi$ 10 del bacteriófago T7 (Rosenberg y col. *Gene*, 56, 125 (1987)). Se insertó el gen de proteína p72 en el vector de expresión pAR3038 a continuación de promotor  $\phi$ 10, siguiendo la estrategia descrita a continuación y representada en forma de diagrama en la Figura 1. Se subclonó un fragmento de restricción XbaI-Bam HI de aproximadamente 3,5 kb, que contenía el gen de p72 completo y precedido por una secuencia de 450 pb, en el vector bacteriófago M 13 mp 18 lo que condujo a un ADN de hebra única. A continuación se hibridó este ADN de hebra única con un oligonucleótido sintético que correspondía a los 17 primeros nucleótidos del gen de p72. Este oligonucleótido se utilizó como cebador para obtener, por medio del fragmento Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*, un ADN de doble hebra parcial. Se digirió luego con nucleasa S1 para eliminar las regiones de hebra única, separándose la nucleasa por extracción con fenol-cloroformo seguido de digestión con BamHI. Se purificó el fragmento resultante de aproximadamente 3 kb por medio de electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se ligó a pAR3038 que había sido tratado subsiguientemente con NdeI, el fragmento Klenow y BamHI. La mezcla de ligado se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* DH5. Las colonias que correspondían a bacterias que habían sido transformadas con plasmidios portadores del gen de p72 completo se separaron por medio de hibridación con el oligonucleótido que se había utilizado como cebador y marcado radiactivamente en su extremo 5' con  $^{32}$ P. Se aisló el ADN plasmídico de los clones seleccionados y subsiguientemente secuenciado. Entre los plasmidios recombinantes así construidos, se seleccionó el conocido como tipo pS72a después de asegurarse que el gen completo se había insertado correctamente adyacente a la región promotora del vector. Este plasmidio se utilizó entonces para transformar la cepa BL21(DE 3) de *E. coli*, haciendo el debido depósito del mismo en la "Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos" del Instituto Pasteur de París. A la muestra se le asignó el registro I-860, de fecha del 26 de mayo de 1989.

Se hicieron crecer las bacterias transformadas con pAR3038 y el plasmidio recombinante pS72a (así como sus derivados obtenidos por medio de delecciones de la región 3' no codificante) a 37°C bajo agitación suave en un medio LB con 200  $\mu$ g/ml de ampicilina hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 1.0 a 600 nm. Se añadió entonces IPTG 1 mM y 45 minutos más tarde rifampicina para conseguir una concentración final de 160  $\mu$ g/ml, incubándose durante otros 45 minutos. Las bacterias se recogieron por centrifugación, luego se volvieron a suspender en PBS y se rompieron utilizando una prensa francesa.

## ES 2 103 749 T3

Se centrifugó la suspensión con las células rotas a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C en un rotor Beckman JA-20. Se distribuyeron la fracción soluble y la fracción insoluble (vuelta a suspender en PBS) en lotes y se almacenaron en el frigorífico a -20°C.

5 Una vez realizada la producción de p72 por una cepa bacteriana, el siguiente objetivo de la invención fue la purificación de la proteína p72 producida en la bacteria con el propósito de obtener el antígeno de mejor calidad posible. Con este fin, se disuelve la fracción insoluble de los extractos en SDS y se purifica preferiblemente mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC). El método de detección de la Peste Porcina Africana (ASF) consiste en la obtención de muestras de suero a partir de animales  
10 de los que se sospecha que padecen la enfermedad y someter las muestras a un ensayo de interacción antígeno-anticuerpo, preferiblemente un ensayo inmuno-enzimático utilizando la proteína p72 obtenida según el procedimiento antes descrito.

### Descripción de las figuras

15 Figura 1: Estrategia seguida en la construcción del plasmidio pS72a

Figura 2: Purificación de la proteína p72 a partir de extractos de BL21(DE 3) de *E. coli* recombinante. El extracto bacteriano se volvió a suspender en SDS al 1% y se cromatografió en una columna de HPLC de exclusión de tamaños moleculares equilibrada y se eluyó con acetato de amonio 0,1 M, pH 5, SDS al 1%, a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. En la parte superior de la figura se muestran los datos de la electroforesis de las fracciones 48 a 50.  
20

Figura 3: Valoración por ELISA de la proteína purificada. Las cantidades de proteína indicadas se unieron a una placa de microvaloración y se ensayaron por un método inmuno-enzimático frente a sueros de cerdos infectados con virus de Peste Porcina Africana (ASF+) comparando con controles no infectados (ASF-).  
25

### Abreviaturas

30 ELISA = Ensayo inmuno-enzimático  
HPLC = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento  
IPTG = B-D-Tiogalactosido de isopropilo  
Kb = kilobase  
35 Kd = kilodaltons  
OPD = O-Fenilen-diamina  
PBS = Solución salina con tampón fosfato  
ASF = Peste Porcina Africana  
40 PT = Tween al 0,1% en PBS  
PTG = Tween al 0,1%, Gelatina al 1% en PBS  
PTHs = Fenil-tio-hidantoinas  
rpm = revoluciones por minuto  
45 SDS = Dodecil sulfato de sodio  
Tris = Tris-hidroxi-metil-aminometano

Los ejemplos siguientes describen la invención con el único propósito de ilustrar la misma. En ningún caso, sin embargo, deben tomarse como exhaustivos.

50 Ejemplos

Ejemplo 1

55 *Demostración de la proteína p72 producida por bacterias*

Se demostró inicialmente por análisis Western la producción por el método descrito de proteína p72 en bacterias siguiendo el método de Burnette (*Anal. Biochem.*, **112**, 195 (1981)). Con este fin, se separaron por electroforesis los extractos obtenidos a partir de bacterias recombinantes en un gel de poliacrilamida/SDS colocado sobre filtro de nitronucleasa y se hibridaron con sueros de cerdos infectados con virus ASFV, así como con controles no infectados. El análisis Western reveló la existencia de una banda que correspondía a una proteína de 72 Kd, reconocida específicamente en el suero positivo, que no aparecía en los extractos de las bacterias transformadas con pAR3038 sin inserción.  
60

## Ejemplo 2

*Purificación de proteína p72 a partir de extractos de BL 21 (DE 3) de E. coli recombinante*

5

Se disolvió la fracción insoluble de los extractos de bacterias recombinantes en SDS al 1% y mercaptoetanol al 0,1%, se llevó entonces a ebullición durante 5 minutos y se aplicó a una columna de HPLC de exclusión de tamaños moleculares. En la Figura 2 se muestran los datos cromatográficos. El análisis electroforético del eluato reveló que las fracciones 48-50 contenían la proteína p72 completamente purificada. El comportamiento cromatográfico de la proteína recombinante coincide con el de la proteína aislada del virus de la infección.

10

## Ejemplo 3

*Comprobación de las propiedades antigénicas de la proteína p72 recombinante*

15

Con el fin de comprobar la calidad del antígeno obtenido por el camino descrito, se fijaron diferentes cantidades de proteína sobre una placa de microvaloración y se hicieron reaccionar con los antisueros antes mencionados. A continuación, los antígenos, diluidos en PBS hasta alcanzar un volumen final de 100 µg/pocillo, se incubaron durante toda la noche sobre placas de microvaloración (Costar, 6595 del catálogo), llevándose a cabo la incubación en cubetas cerradas herméticamente que contenían papel de filtro empapado con agua para asegurar un entorno húmedo. Después de separar los residuos de muestra, se bloquearon las placas durante dos horas con 200 µl de PTG (Tween 20 al 0,1%, gelatina al 1% en PBS) por pocillo. A continuación, se incubaron las muestras durante una hora con el anticuerpo diluido 50 veces con PTG y se lavaron 6 veces con PT (Tween 20 al 0,1% en PBS). El revelado se hizo con proteína A conjugada con peroxidasa. El producto se lavó de nuevo y luego se incubó durante 5 minutos con 100 µl/pocillo de OPD (O-fenilen diamina) de 1 mg/ml, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,2% en un tampón citrato-fosfato, pH 5. La reacción se bloqueó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M y se midió la absorbancia a 450 nm. De los resultados obtenidos (Figura 3) se puede llegar a la conclusión de que en las condiciones experimentales 100 ng de proteína p72 recombinante por pocillo serían suficientes para asegurar una diferenciación a prueba de fallos entre suero animal infectado y no infectado.

20

25

30

## Ejemplo 4

*Ensayo inmuno-enzimático de sueros de 17 cerdos con utilización paralela de proteína p72 producida por E. coli y un antígeno comercial*

35

Aplicando el procedimiento descrito en el ejemplo precedente, se ensayó la reactividad de sueros de 17 cerdos frente a la proteína producida en el sistema de la presente invención y un antígeno comercializado en forma de "listo para su uso", es decir, fijado a placas de microvaloración. Las condiciones de ensayo eran idénticas para ambos antígenos. Se midió la absorbancia a 450 nm, lo que condujo a los resultados enumerados a continuación para cada suero:

40

45

50

55

60

## ES 2 103 749 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60

| Suero   | Agente comercial |             | p72 recombinante |             |
|---------|------------------|-------------|------------------|-------------|
|         | A                | Diagnóstico | A                | Diagnóstico |
| 1       | 0,797            | positivo    | 0,978            | positivo    |
| 2       | 0,791            | positivo    | 1,084            | positivo    |
| 3       | 0,775            | positivo    | 0,945            | positivo    |
| 4       | 0,162            | negativo    | 0,190            | negativo    |
| 5       | 0,186            | negativo    | 0,223            | negativo    |
| 6       | 0,560            | dudoso      | 0,160            | negativo    |
| 7       | 0,142            | negativo    | 0,205            | negativo    |
| 8       | 0,165            | negativo    | 0,220            | negativo    |
| 9       | 0,781            | positivo    | 0,928            | positivo    |
| 10      | 0,758            | positivo    | 1,057            | positivo    |
| 11      | 0,791            | positivo    | 0,928            | positivo    |
| 12      | 0,124            | negativo    | 0,234            | negativo    |
| 13      | 0,131            | negativo    | 0,243            | negativo    |
| 14      | 0,116            | negativo    | 0,218            | negativo    |
| 15      | 0,178            | negativo    | 0,249            | negativo    |
| Control | +0,791           | positivo    | 1,079            | positivo    |
| Control | -0.151           | negativo    | 0,246            | negativo    |

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparación de un método de ensayo para Virus de Peste Porcina Africana (ASFV) que comprende las siguientes etapas

- (a) purificación de la proteína p72 de una cápsida viral y obtención de la secuencia parcial de amino ácidos T-P-D-D-P-G-A-M-M-I-T-F
- (b) identificación del gen que codifica la citada proteína por medio de una sonda de oligonucleótidos marcada radiactivamente que contiene una mezcla de oligonucleótidos, cuya secuencia ha sido derivada de la secuencia parcial de aminoácidos obtenida en (a) anterior;
- (c) identificación de la secuencia completa de nucleótidos del citado gen
- (d) expresión del citado gen en BL21(DE 3) de *E. coli*. por medio de un plasmidio pAR3038 con lo que la proteína p72 localizada en fragmento EcoRIB del genoma del Virus de la Peste Porcina Africana se expresa por clonación del mismo en el citado plasmidio para obtener un plasmidio pS72a recombinante, y transformación del citado plasmidio con dicho huésped bacteriano.
- (e) cultivo del citado plasmidio recombinante y purificación de la proteína p72 de los extractos obtenidos;
- (f) ligado de la proteína purificada a las placas de microvaloración e incubación junto con muestras de sueros de cerdos para ensayarlas en cuanto a la presencia de anticuerpos frente a Virus de Peste Porcina Africana.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se purifica la proteína mayoritaria de la cápsida, p72, por cromatografía de líquidos de alto rendimiento a partir de virus extracelular.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2 **caracterizado** porque se obtiene la secuencia parcial de amino ácidos T-P-D-D-P-G-A-M-M-I-T-F de la proteína p72 a partir del péptido resultante de la digestión de la enzima de la proteína p72 purificada por cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

4. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la identificación del gen de la proteína p72 se logra por medio de la utilización de oligonucleótidos sintéticos cuya secuencia deriva de la secuencia de amino ácidos obtenida.

5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque las bacterias recombinantes obtenidas en la etapa precedente se hacen crecer en un medio líquido lo cual induce la producción de proteína p72, purificándose esta última desde los citados extractos bacterianos por medio de cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la proteína recombinante p72 purificada obtenida en la etapa precedente se fija sobre placas de microvaloración (100 ng/pocillo), se incuba durante 20 horas a temperatura ambiente sobre placas herméticamente cerradas; separando después los residuos de muestra, se bloquean las placas durante 2 horas con 200  $\mu$ l de PTG por pocillo; se incuban en las mismas condiciones durante 1 hora con el suero problema diluido 50 veces con PTG, se lava con PT y se incuba con proteína A conjugada con peroxidasa; se lavan con PT y se incuban durante 5 minutos con 100  $\mu$ l/pocillo de OPD de 1 mg/ml y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,2% en agente tampón citrato-fosfato, pH 5; la reacción se bloquea con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M, midiéndose la absorbancia a 450 nm.

7. Un procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la detección de anticuerpos anti-p72 se hace utilizando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa u otra enzima adecuada.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

---



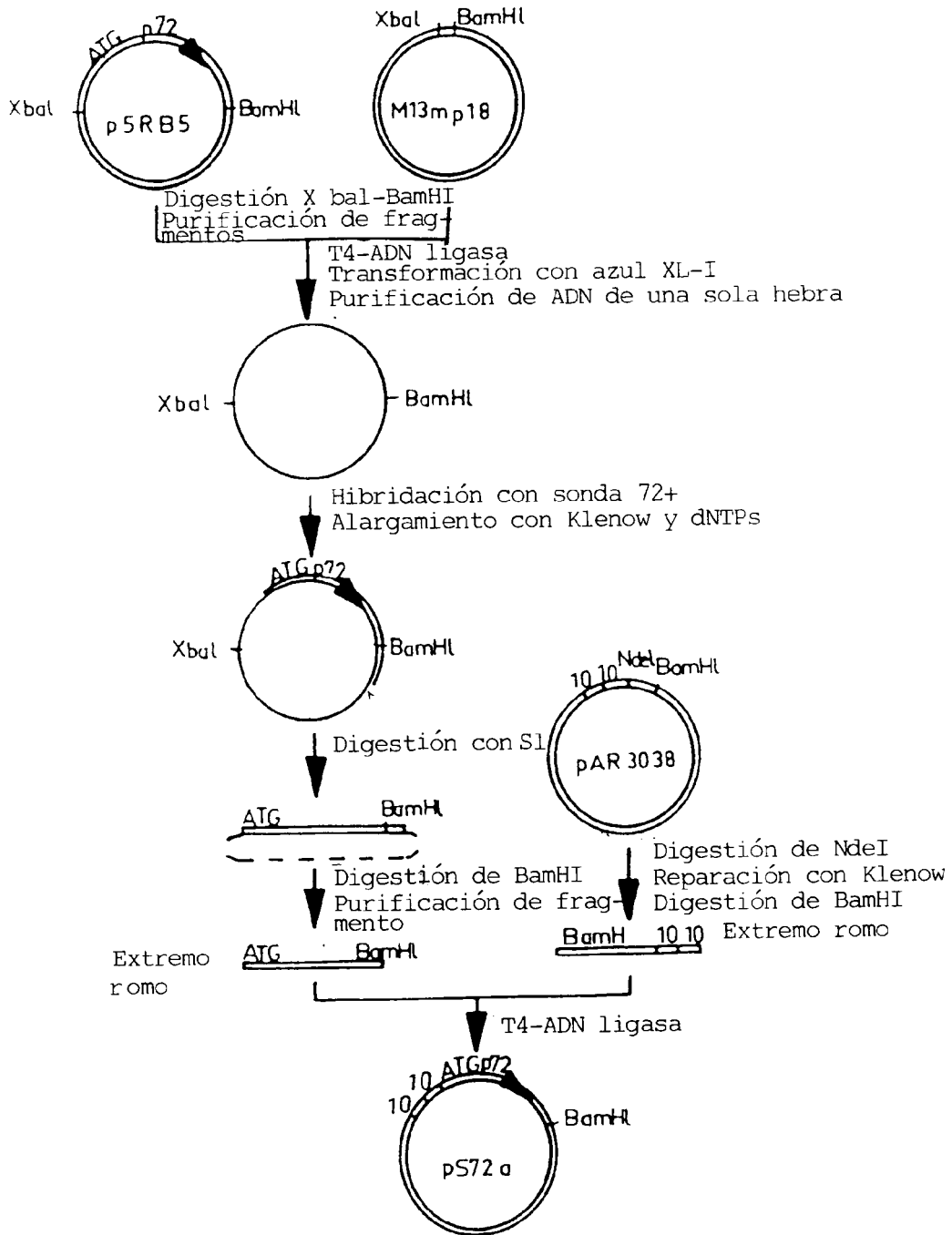


FIG. 1

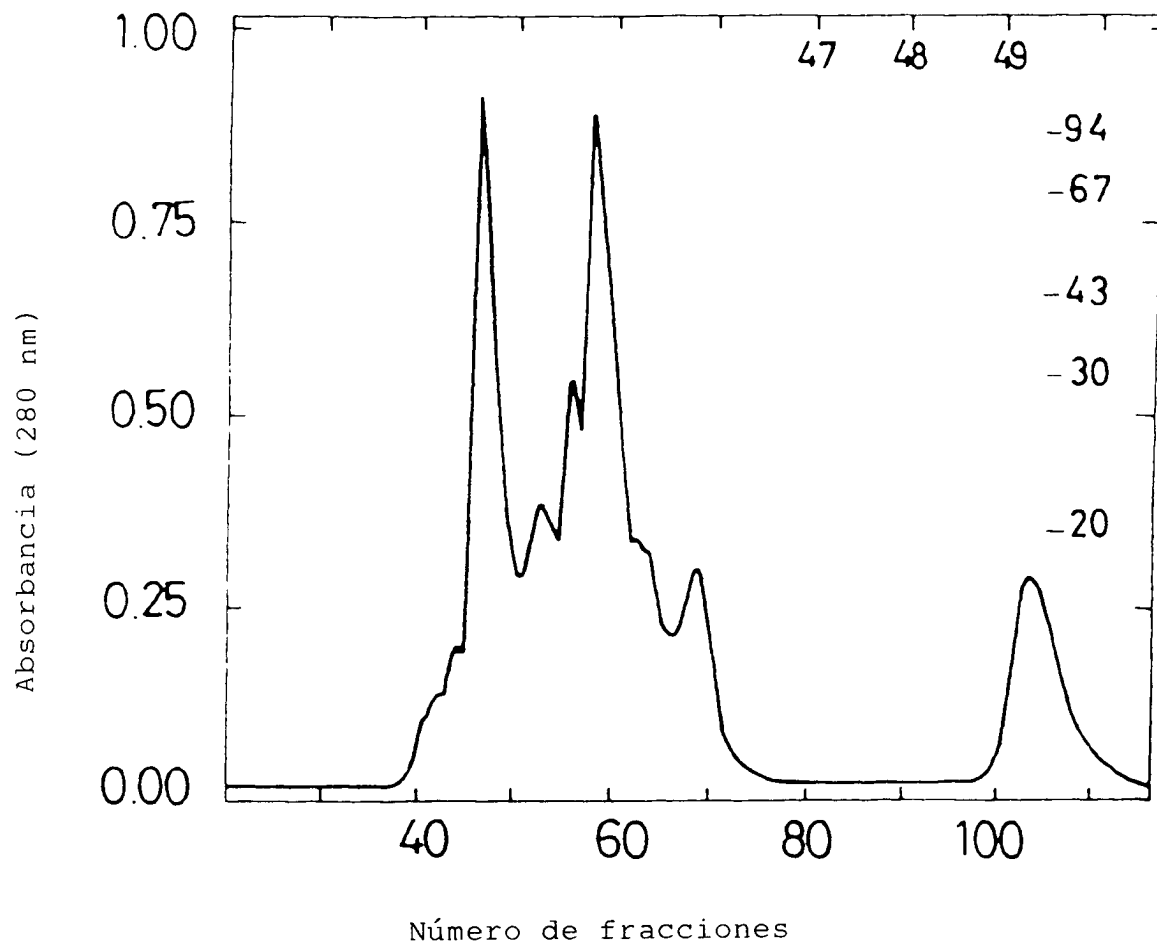


FIG. 2

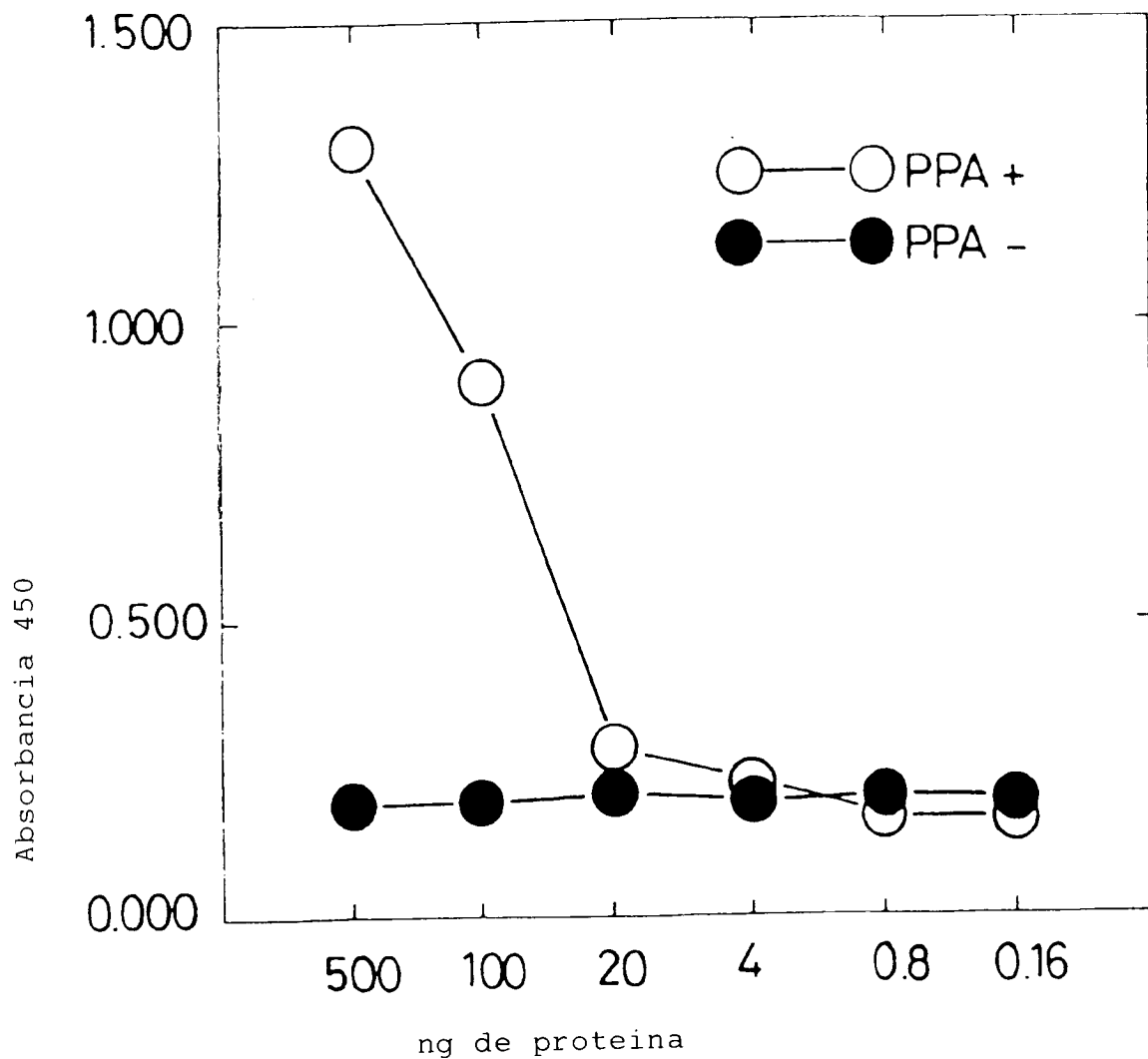


FIG. 3